

Contribution à l'Etude  
DE  
L'action synthétisante  
de la galactosidase  $\beta$

---

THÈSE

Pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université de Paris

(PHARMACIE)

*Présentée et soutenue le Janvier 1918.*

PAR

**G. MOUGNE**

Pharmacien de 1<sup>re</sup> classe  
Licencié ès-sciences naturelles  
Ex-Interne des Hôpitaux de Paris  
Ex-Préparateur des Travaux pratiques de Microbiologie  
à l'Ecole supérieure de Pharmacie de Paris.

---

JURY } MM. BOURQUELOT, Président.  
GRIMBERT, Professeur.  
BOUGAULT, Agrégé.

---

LONS-LE-SAUNIER  
IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE LUCIEN DECLUME

—  
1918







UNIVERSITÉ DE PARIS

ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

Année 1917-1918.

N° 1.

---

Contribution à l'Etude  
DE  
L'action synthétisante  
de la galactosidase  $\beta$

---

THÈSE

Pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université de Paris

(PHARMACIE)

*Présentée et soutenue le Janvier 1918.*

PAR

**G. MOUGNE**

Pharmacien de 1<sup>re</sup> classe

Licencié ès-sciences naturelles

Ex-Interne des Hôpitaux de Paris

Ex-Préparateur des Travaux pratiques de Microbiologie  
à l'Ecole supérieure de Pharmacie de Paris.

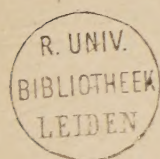
JURY { MM. BOURQUELOT, Président.  
GRIMBERT, Professeur.  
BOUGAULT, Agrégé.

---

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE LUCIEN DECLUME

1918



# PERSONNEL DE L'ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

## ADMINISTRATION

MM. H. GAUTIER, Directeur, \*, ☉ I.  
 BOURQUELOT, Assesseur, \*, ☉ I.  
 G. DURSANT, Secrétaire, ☉ I.

## PROFESSEURS

MM. GUIGNARD, Membre de l'Institut, O. \*, ☉ I..... Botanique générale.  
 VILLIERS, \*, ☉ I..... Chimie analytique.  
 BOURQUELOT, \*, ☉ I..... Pharmacie galénique.  
 H. GAUTIER, \*, ☉ I..... Chimie minérale.  
 RADAIS, \*, ☉ I..... Cryptogamie.  
 BÉHAL, O. \*, ☉ I..... Chimie organique.  
 PERROT, \*, ☉ I..... Matière médicale.  
 COUTIÈRE, \*, ☉ I..... Zoologie.  
 BERTHELOT, ☉ I..... Physique.  
 GRIMBERT, \*, ☉ I..... Chimie biologique.  
 MOUREU, Membre de l'Institut, \*, ☉ I..... Pharmacie chimique.  
 LEBEAU, ☉ I..... Toxicologie.  
 DELÉPINE, ☉ I..... Hydrologie et Hygiène  
*Directeur honoraire* : M. GUIGNARD, O. \*, ☉ I.  
*Professeur honoraire* : M. BOUCHARDAT, O. \*, ☉ I.

## AGREGÉS EN EXERCICE

|                   |                  |
|-------------------|------------------|
| MM. GUERBET, ☉ I. | MM. GUÉRIN, ☉ I. |
| VALEUR, *, ☉ I.   | LUTZ, ☉ I.       |
| BOUGAULT, ☉ I.    | GORIS, ☉ I.      |
| SOMMELET, ☉ I.    | LAUNOY           |
| DAMIENS.          | HÉRISSEY, ☉ I.   |
| TASSILLY, ☉ I.    |                  |

## CHARGÉS DE COURS

MM GUERBET, ☉ I..... Minéralogie.  
 MARC HONNORAT, ☉ I..... Législation et Déontologie pharmaceutiques

## CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DEFACQZ, ☉ I..... Chimie générale.  
 COUSIN, ☉ I..... Chimie analytique.  
 SOUÈGES, ☉ A..... Micrographie.  
 MOURLOT, ☉ I..... Physique.  
 BARTHELAT, \*, ☉ I..... Microbiologie.  
 JAVILLIER, ☉ I..... Trav. généraux de 4<sup>e</sup> année.

*Chef du Laboratoire des examens pratiques* : M. JAVILLIER ☉ I.

*Bibliothécaire en Chef* : M. DORVEAUX, ☉ I.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR BOURQUELOT,

Pharmacien en Chef de l'Hôpital Laënnec

Membre de l'Académie de Médecine.

*Hommage de respect et de reconnaissance.*



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

## INTRODUCTION.

---

Au cours de ces dernières années, MM. BOURQUELOT, HÉRISSEY et BRIDEL ont réalisé, à l'aide de l'émulsine des amandes (méthode biochimique), la synthèse d'un certain nombre d'alcoolgalactosides  $\beta$ . Ce sont :

L'éthylgalactoside  $\beta$  (1)  $\alpha_D = -4^\circ$ .

Le méthylgalactoside  $\beta$  (2)  $\alpha_D = \pm 0$ .

L'allylgalactoside  $\beta$  (2)  $\alpha_D = -12^\circ, 15$ .

Le propylgalactoside  $\beta$  (3)  $\alpha_D = -8^\circ, 86$ .

Le benzylgalactoside  $\beta$  (3)  $\alpha_D = -25^\circ, 05$ .

L'isobutylgalactoside  $\beta$  (4)  $\alpha_D = -11^\circ$ .

Le monogalactoside  $\beta$  du glycol (5)  $\alpha_D = \pm 0$ .

Le salicylgalactoside  $\beta$  (6)  $\alpha_D = -11^\circ, 3$ .

Seuls les deux premiers de ces composés étaient connus avant leurs recherches.

(1) Em. BOURQUELOT et H. HÉRISSEY. — Synthèse de galactosides d'alcools à l'aide de l'émulsine : éthylgalactoside  $\beta$ . — *Journ. Pharm. et Chim.* (7), VI, p. 385, 1912.

(2) Em. BOURQUELOT et M. BRIDEL. — Synthèse de galactosides d'alcools à l'aide de l'émulsine : méthylgalactoside  $\beta$  et allylgalactoside  $\beta$ . — *Journ. Pharm. et Chim.* (7), VII, p. 444, 1913.

(3) Em. BOURQUELOT, H. HÉRISSEY et M. BRIDEL. — Synthèse de galactosides à l'aide de l'émulsine : propylgalactoside  $\beta$  et benzylgalactoside  $\beta$ . — *Journ. Pharm. et Chim.* (7), VII, p. 285, 1913.

(4) Em. BOURQUELOT et M. BRIDEL. — Synthèse biochimique de galactosides d'alcools : isobutylgalactoside  $\beta$ . — *Journ. Pharm. et Chim.* (7), VIII, p. 108, 1913.

(5) Em. BOURQUELOT, M. BRIDEL et A. AUBRY. — Synthèse biochimique du mono-d-galactoside  $\beta$  du glycol éthylénique. — *Journ. Pharm. et Chim.*, (7), XI, p. 201, 1915.

(6) Em. BOURQUELOT et A. AUBRY. — Synthèse biochimique d'un galactoside de la saligénine, le salicylgalactoside  $\beta$ . — *Journ. Pharm. et Chim.*, (7), XIII, p. 273, 1916.

En 1895, E. FISCHER (1) a obtenu, par voie purement chimique, le méthylgalactoside  $\beta$ . Son procédé consiste à traiter à chaud le galactose par l'alcool renfermant une faible dose d'acide chlorhydrique.

Mais, par cette méthode, on obtient toujours un mélange de 2 stéréoisomères : l'un, qu'on a appelé  $\alpha$  est dextrogyre ; MM. H. HÉRISSEY et A. AUBRY (2) ont constaté que ce corps est hydrolysé très lentement par une macération aqueuse de levure de bière basse séchée à l'air ; l'autre  $\beta$  est lévogyre et hydrolysé par l'émulsine des amandes.

La synthèse de l'éthylgalactoside  $\beta$  a été effectuée, en 1902, par E. FISCHER et E.-F. ARMSTRONG (3) à l'aide du  $\beta$ -acétochlorogalactose.

La méthode à l'émulsine présente l'avantage de ne donner qu'un seul stéréoisomère, le stéréoisomère  $\beta$ , hydrolysable en solution aqueuse par le ferment qui a servi dans la préparation.

Dans leurs recherches, MM. BOURQUELOT, HÉRISSEY et BRIDEL se sont contentés de préparer quelques grammes de chacun de ces galactosides de façon à pouvoir identifier ceux qui étaient déjà connus et déterminer les propriétés principales de ceux qui étaient préparés pour la première fois.

Ainsi, ces auteurs ont trouvé que les pouvoirs rotatoires du méthylgalactoside  $\beta$  et de l'éthylgalactoside  $\beta$  avaient des valeurs égales à ceux des galactosides obtenus synthétiquement par E. FISCHER et E.-F. ARMSTRONG suivant le procédé chimique.

(1) E. FISCHER. — Ueber die Verbindungen der Zucker mit den Alkoholen und Ketonen. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, t. 1, p. 1154, 1895.

(2) H. HÉRISSEY et A. AUBRY. — Synthèse biochimique des d-galactosides  $\alpha$ . Méthylgalactoside  $\alpha$ . — *Journ. de Pharm. et de Chim.* (7), IX, p. 225, 1914.

(3) Ueber die isomeren Aceto-halogen-Derivate der Zucker und die Synthese der Glucoside. (*Ber. chem. Ges.*, XXXV, p. 3153, 1912).

Mais on comprend qu'il y avait intérêt à rechercher, au moins pour quelques-uns d'entre eux, les conditions expérimentales les meilleures dans lesquelles on pourrait les obtenir en grande quantité.

Suivant les conseils de M. le Professeur BOURQUELOT, mes recherches ont porté sur la synthèse du méthylgalactoside  $\beta$  et de l'éthylgalactoside  $\beta$ .

A cet effet, ayant fait varier méthodiquement, dans plusieurs séries d'essais, les différents facteurs de la réaction : titre alcoolique, proportion de galactose, température, il m'a été possible de fixer les meilleures conditions de synthèse.

De cette façon, j'ai pu préparer de grandes quantités de ces 2 galactosides, ce qui m'a permis de les obtenir absolument purs, et de rectifier les données relatives à leur pouvoir rotatoire et à leur point de fusion.

J'ai trouvé pour le méthylgalactoside  $\beta$  pur,  $\alpha_D = -0^{\circ},419$  et pour l'éthylgalactoside  $\beta$  pur (1)  $\alpha_D = -7^{\circ},21$ , alors que le premier était considéré comme inactif et qu'on indiquait comme pouvoir rotatoire du second  $-4^{\circ}$ .

Au cours de ces recherches sur la synthèse des alcoolgalactosides  $\beta$ , une question s'est posée, qui est celle de savoir si le ferment effectuant cette synthèse est le même que celui qui dédouble le lactose en glucose et en galactose, c'est-à-dire que la lactase. On a supposé d'abord que ces 2 ferments étaient identiques.

Un certain nombre de faits peuvent être cités qui viennent à l'appui de cette hypothèse :

Ainsi, MM. BOURQUELOT et HÉRISSEY (2) ont réussi à préparer l'éthylgalactoside  $\beta$  en traitant une solution de

(1) M. BOURQUELOT a fait depuis lors de nouvelles déterminations portant sur 2 échantillons de ce galactoside et a trouvé comme moyenne  $\alpha_D = -6^{\circ},69$ .

(2) Em. BOURQUELOT et H. HÉRISSEY. — Réaction synthétisante entre le galactose et l'alcool éthylique sous l'influence du Képhir. *Journal Pharmacie et Chimie* (7), VII, p. 110, 1913.

galactose dans l'alcool éthylique par une macération aqueuse de grains de Képhir que l'on sait riches en lactase. Ainsi encore, j'ai constaté la formation du même galactoside en faisant agir sur la solution éthylique de galactose, soit le produit fermentaire des amandes de prunes, de pêches, d'abricots, de cerises ou de semences de pommier et de moutarde, soit des feuilles fraîches de laurier cerise, d'aucuba ou de raifort, produits qui, comme l'a établi BRACHIN (1), hydrolysent le lactose et renferment par conséquent de la lactase.

Nous verrons au cours de ce travail que d'autres faits encore semblent indiquer l'identité des deux ferments, mais qu'il en est d'autres qui prouvent qu'ils ne sont pas identiques.

La préparation, par voie biochimique, des galactosides d'alcools exige l'emploi, d'une part, de galactose-d en solution dans l'alcool que l'on veut galactosidifier, d'autre part, du ferment.

Le galactose a été préparé d'après les méthodes indiquées dans le premier chapitre.

On a employé, comme source de ferment, le produit fermentaire (émulsine) préparé avec les amandes douces suivant le procédé ROBIQUET perfectionné par M. HÉRISSEY (2).

On a traité 14 kilos d'amandes douces dont le rendement moyen a été de 21 gr. d'émulsine par kilogr.

Dans tous les essais effectués au cours de ce travail, j'ai dosé le sucre réducteur par le procédé de M. G. BERTRAND (3), procédé dont le principe a été indiqué autrefois par MOHR (4) : cette méthode donne des résultats d'une grande précision.

(1) A. BRACHIN. — Recherches sur la lactase. *Thèse Doct. Univ. (Pharm.)* Paris, 1904.

(2) Recherches sur l'émulsine. *Thèse Doct. Univ. (Pharm.)* Paris 1899.

(3) Le dosage des sucres réducteurs. *Bull. Soc. Chim.* (3), XXXV, XXXVI, p. 1287, 1906.

(4) *Zeit. f. analyt. Chim.*, XII, p. 296, 1873.

L'alcool contenu dans les mélanges fermentaires pouvant entraîner des erreurs dans les dosages, on l'a évaporé et on a repris le résidu par de l'eau distillée de façon à effectuer le dosage en solution aqueuse.

En dehors du Chapitre premier qui traite de la préparation du galactose, mon travail est divisé en 4 parties.

La *Première Partie* renferme les résultats des essais effectués en vue d'établir la spécificité de la galactosidase  $\beta$ , notamment sa séparation d'avec la lactase.

La *Deuxième Partie* est consacrée à l'étude de l'action synthétisante de la galactosidase  $\beta$  dans l'alcool éthylique.

La *Troisième Partie* contient les expériences effectuées avec l'alcool méthylique.

Enfin la *Quatrième Partie* est réservée aux recherches de la galactosidase  $\beta$  dans le règne végétal.

La *Première Partie* ne contient qu'un chapitre dans lequel sont exposées les expériences effectuées avec les alcools méthylique, éthylique, amylique et avec l'acétone, expériences qui semblent démontrer l'individualité de la galactosidase  $\beta$ .

La *Deuxième Partie* est divisée en 3 chapitres :

Le premier traite de l'action synthétisante de la galactosidase  $\beta$  dans des alcools éthyliques de concentrations variées, la proportion de galactose contenue dans le mélange fermentaire étant fixe.

Dans le deuxième, j'ai étudié l'influence de la température sur la marche de la synthèse.

Dans le troisième sont rassemblées les conditions expérimentales les mieux appropriées à la préparation de l'éthylgalactoside  $\beta$ .

La *Troisième Partie* est divisée en 3 chapitres :

On a répété avec l'alcool méthylique les mêmes expériences qu'avec l'alcool éthylique.

Dans le Chapitre I, on trouvera les résultats des essais

de synthèse effectués avec l'alcool méthylique à différentes concentrations.

J'ai étudié dans le Chapitre II, l'influence de la température sur la limite de la réaction synthétisante.

Dans le Chapitre III, j'ai indiqué les meilleures conditions à réaliser pour préparer le méthylgalactoside  $\beta$ .

La *Quatrième Partie* est divisée en 2 chapitres :

Le premier contient les essais ayant pour objet la recherche de la galactosidase  $\beta$  dans le règne végétal.

Dans le Chapitre II, sont exposés quelques essais de préparation d'éthylgalactoside  $\beta$  effectués à l'aide de produits fermentaires dans lesquels j'ai constaté la présence de la galactosidase  $\beta$ .

Enfin un dernier chapitre est réservé aux conclusions.

Ce travail a été accompli dans le laboratoire de M. le Professeur BOURQUELOT.

Que ce Maître bienveillant veuille bien me permettre de lui exprimer ici ma respectueuse reconnaissance pour les conseils éclairés et les encouragements qu'il m'a toujours prodigués.

Je prie également M. HÉRISSEY, Agrégé près l'Ecole Supérieure de Pharmacie, d'agréer l'expression de mes plus vifs remerciements pour les précieux renseignements qu'il m'a fournis au cours de cette étude.

Je n'oublierai pas mon excellent ami BRIDEL, à qui j'adresse mes plus sincères remerciements.

Grâce à cet ami dévoué, j'ai pris grand intérêt aux recherches scientifiques et par ses nombreux conseils auxquels j'ai eu très souvent recours, il m'a beaucoup facilité le travail que j'avais entrepris.

---

## CHAPITRE I.

---

### Méthode de préparation du galactose.

---

J'avais besoin, pour mener à bien ce travail, d'une assez forte proportion de galactose pur.

Je me suis donc attaché, avant toute chose, à préparer moi-même ce galactose.

Pour obtenir le galactose à l'état cristallisé, on a recours à l'hydrolyse du lactose par l'acide sulfurique, d'après la méthode indiquée, en 1887, par M. BOURQUELOT (1).

C'est cette méthode que j'ai suivie. Toutefois, j'ai opéré dans un autoclave à  $+ 105^{\circ}$ - $110^{\circ}$ , pendant 4 heures au lieu de faire l'hydrolyse dans des bouteilles fermées hermétiquement et plongées dans un bain de chlorure de calcium qu'on chauffait graduellement jusqu'à  $105^{\circ}$ - $106^{\circ}$ , température que l'on maintenait pendant une heure.

Voilà en détail, une opération.

On a dissous 75 gr. de lactose dans 400 cm<sup>3</sup> d'eau distillée et on a ajouté 6 gr. d'acide sulfurique pur : l'hydrolyse a donc lieu dans de l'acide sulfurique à 1,5 p. 100 environ.

On a porté la solution à  $+ 105^{\circ}$ - $110^{\circ}$ , dans un autoclave, pendant 4 heures ; on a neutralisé au carbonate de chaux, essoré à la trompe et évaporé, sous pression réduite, jusqu'à un poids de 95 gr. On a alors amorcé le sirop épais ; la cristallisation a demandé 8 jours environ.

(1) E. BOURQUELOT. — Recherches sur le galactose et l'arabinose. — *Association française pour l'avancement des sciences*, 2<sup>e</sup> partie, p. 338 1887.

On a essoré les cristaux ; l'essorage de ces cristaux, baignant dans un liquide sirupeux très dense, est long et exige 3 à 4 jours.

Les cristaux obtenus ont été lavés avec de l'alcool à 80°, essorés de nouveau et mis à sécher. On les a repris ensuite par de l'alcool à 75° bouillant qui a laissé déposer le galactose cristallisé encore impur. Une nouvelle cristallisation a fourni un produit pur.

Finalement, de 7.100 gr. de lactose, on a obtenu d'abord 900 gr. de galactose impur, soit un rendement de 25,3 p. 100 de la théorie, et 680 gr. de produit pur, soit 19 p. 100.

Cette méthode qui conduit sûrement à un produit pur, est assez longue et j'ai cherché à obtenir le galactose du lactose plus facilement.

M. BOURQUELOT (1) a montré, en 1887, que la levure de bière haute ne faisait pas fermenter le galactose, même en présence d'une petite quantité de glucose, tandis que la levure de bière basse le faisait fermenter.

On a pensé qu'en additionnant le liquide d'hydrolyse neutralisé de levure de bière haute, le glucose seul serait détruit et qu'on obtiendrait un liquide d'où il serait plus facile d'extraire le galactose.

En conséquence, dans une opération portant sur 750 gr. de lactose on a neutralisé le liquide d'hydrolyse par le carbonate de chaux et on l'a dilué de façon à obtenir une solution renfermant 15 p. 100 de sucre. On a ajouté de la levure de bière haute, 3 gr. pour 100 cm<sup>3</sup>, et on a laissé fermenter.

La fermentation très rapide les 2 ou 3 premiers jours s'est ralentie brusquement et a continué d'une façon à peine sensible pendant plus d'un mois. Au bout de ce temps, *et bien que la fermentation ne fût pas encore*

(1) *Loc. cit.*

*terminée*, on a filtré, on a fait bouillir et on a distillé le liquide à sec.

On a obtenu, en partant de 750 gr. de lactose, un résidu de 160 gr. seulement. En outre, il a été impossible d'extraire de ce résidu du galactose cristallisé.

J'ai supposé que la levure de bière haute employée n'était pas absolument pure et qu'elle pouvait renfermer des traces de levure basse qui, comme l'on sait, possède la propriété de faire fermenter le galactose.

Par suite, si on voulait obtenir de bons résultats avec cette méthode, il fallait suivre la marche de la fermentation avec soin. On a donc recommencé en opérant de la façon suivante :

Le liquide d'hydrolyse de 750 gr. de lactose a été dilué, après neutralisation, de façon à obtenir une solution renfermant 10 p. 100 de sucre, soit à 7.500 cm<sup>3</sup>.

Cette solution présentait une rotation de + 12°26', rotation provenant à la fois du glucose et du galactose.

La rotation produite par le glucose étant de 5°14', quand au cours de la fermentation, la rotation sera devenue + 7°12', on devra arrêter la fermentation.

On a ajouté alors 3 p. 100 de levure et on a suivi la marche de l'opération au polarimètre.

|                    |   |          |
|--------------------|---|----------|
| Déviatiou initiale |   | + 12°26' |
| « après 2 heures   |   | + 11°14' |
| « 4                | — | + 10°36' |
| « 6                | — | + 10°    |
| « 21               | — | + 7°6'   |

Etant donné ce qui a été dit plus haut, la fermentation du glucose devait être terminée et on a arrêté l'opération. On a filtré, on a porté le liquide à l'ébullition, filtré de nouveau et on a évaporé à sec.

On a obtenu un résidu de 385 gr., poids correspondant sensiblement à celui du galactose provenant de 750 gr. de lactose.

On a repris ce résidu par 1000 cm<sup>3</sup> d'alcool à 75°. Par refroidissement et repos, le galactose a cristallisé.

On l'a recueilli, lavé à l'alcool à 85° et séché à l'étuve à + 30°. Il y en avait 125 gr.

Un nouveau traitement en a fourni encore 35 gr., soit en tout 160 gr., ce qui représente un rendement de 42,6 p. 100. Par une nouvelle cristallisation dans l'alcool à 75°, on a obtenu un produit pur.

Finalement on a réuni tous les galactoses provenant de diverses cristallisations et l'on a eu ainsi près de 1.000 gr. de produit pur. Ce galactose, séché à l'air, présentait un pouvoir rotatoire de :

$$\alpha_D = + 79^{\circ},75$$

( $p = 2,4765$  ;  $v = 50$  ;  $l = 2$  ;  $\alpha = + 7^{\circ}54'$  ;  $t = + 20^{\circ}$ )

En résumé, par hydrolyse du lactose, j'ai préparé près de 1 kgr. de galactose pur dont j'avais besoin pour mes expériences.

Au cours de cette préparation, j'ai reconnu qu'en ayant recours à la fermentation du glucose par la levure de bière haute, en suivant avec soin la marche de la fermentation, on obtient une proportion de galactose cristallisé s'élevant à 42 p. 100 de la théorie.

La méthode que j'ai indiquée est plus rapide et donne de meilleurs rendements que l'ancienne qui était basée sur la cristallisation du galactose au sein d'un sirop épais très chargé en glucose.

---

## PREMIÈRE PARTIE.

---

### Spécificité de la galactosidase $\beta$ .

---

On a vu précédemment que, lors de la découverte de l'action synthétisante de l'émulsine des amandes sur le galactose en solution alcoolique, on a émis l'opinion que cette action était due à la présence, dans l'émulsine, de la lactase, ferment qui hydrolyse le lactose.

Cette hypothèse s'appuyait sur ce qu'avec le képhyr, produit riche en lactase, on avait constaté une action synthétisante sur le galactose en solution dans l'alcool éthylique. Cette action était faible, à vrai dire, mais elle n'en était pas moins nette.

Ce qui rapproche encore, au point de vue fermentaire, le lactose et les alcoolgalactosides  $\beta$ , c'est le fait que leur hydrolyse atteint sa valeur optimale à la même température.

On sait que BRACHIN a montré que c'est vers  $+ 38^{\circ}$ - $40^{\circ}$  que la lactase possède le maximum d'activité.

D'autre part, j'ai constaté qu'en ajoutant 0,20 d'émulsine à une solution de lactose à 1 p. 100, maintenue à  $+ 40^{\circ}$ , on arrivait à une hydrolyse à peu près complète en 6 jours. A la température ordinaire, l'hydrolyse n'a porté, en 15 jours, que sur 44,55 p. 100 du lactose.

Il en est de même pour les alcoolgalactosides  $\beta$ . On a fait agir l'émulsine sur une solution à 1 p. 100 d'éthylgalactoside  $\beta$ , à la température ordinaire et à  $+ 40^{\circ}$ . A la

température ordinaire, la rotation a passé, en 28 jours, de  $-12'$  à  $+10'$ , tandis qu'à  $+40^\circ$ , il a fallu seulement 6 jours pour que la rotation passe de  $-12'$  à  $+10'$  et 17 jours pour qu'elle atteigne  $+22'$ .

J'ai voulu m'assurer si la lactase était bien le ferment des alcoolgalactosides  $\beta$ . On comprend l'intérêt théorique de cette question : s'il en était ainsi, le lactose devrait être considéré comme un alcoolgalactoside  $\beta$  et l'on devrait admettre l'existence d'un lactose  $\alpha$  à ranger dans les alcoolgalactosides  $\alpha$ .

J'ai fait dans ce but un certain nombre d'essais.

Je décrirai d'abord ceux qui semblent montrer que l'on est en présence d'un seul ferment, puis ceux qui prouvent que la lactase n'est pas le ferment des alcoolgalactosides  $\beta$ , que ce dernier ferment est bien spécifique et qu'on peut, par suite, l'appeler « *galactosidase  $\beta$*  ».

On s'est servi, comme source de ferment, de l'émulsine des amandes à laquelle on a fait subir des traitements appropriés pour déterminer la destruction d'un de ces ferments.

On a fait agir l'émulsine ainsi traitée sur 6 solutions aqueuses renfermant chacune, pour 100 cm<sup>3</sup>, la 1<sup>re</sup>, 1 gr. de méthylgalactoside  $\beta$ , la 2<sup>e</sup>, 1 gr. d'éthylgalactoside  $\beta$ , la 3<sup>e</sup>, 1 gr. de méthylglucoside  $\beta$ , la 4<sup>e</sup>, 1 gr. de salicine, la 5<sup>e</sup>, 1 gr. d'amygdaline et la 6<sup>e</sup>, 1 gr. de lactose.

Dans les solutions de galactosides ou de glucosides, on a suivi l'action du ferment au moyen du polarimètre.

Pour le lactose, il a été impossible d'employer la même méthode.

En effet, une solution à 1 p. 100 de lactose accuse une rotation de  $+1^\circ 3'$ ; après hydrolyse totale, cette rotation passe à  $+1^\circ 19'$ , soit une différence minime de 16'. En plus, l'hydrolyse du lactose par l'émulsine n'est jamais totale et une hydrolyse de 20 p. 100 ne donnerait qu'une différence de rotation de 3', différence trop faible pour

qu'on puisse en déduire sûrement qu'il y a eu hydrolyse.

On peut augmenter la différence en opérant sur des solutions plus concentrées, mais l'appréciation n'en reste pas moins délicate et l'on a préféré avoir recours à un procédé plus sûr : on a suivi la marche de l'hydrolyse par des dosages répétés de sucre réducteur.

Ainsi, soit une solution de lactose dont 5 cm<sup>3</sup> exigent 6 cm<sup>3</sup>,9 d'une liqueur titrée de permanganate (1 cm<sup>3</sup> = 0,009846 de Cu) ; en consultant les tables publiées par G. BERTRAND, on trouve que cette solution renferme 49 milligr.,58 de lactose anhydre dans 5 cm<sup>3</sup>.

Après hydrolyse totale, le sucre réducteur contenu dans la solution s'élèvera à :

$$\frac{360 \times 49,58}{342} = 52 \text{ milligr.},18$$

Ce chiffre représente la somme des poids du glucose et du galactose, mais comme on sait que ces deux sucres, qui se forment en quantité équimoléculaire, possèdent un pouvoir réducteur différent, on aura les résultats suivants :

|      |             |            |              |                  |             |            |
|------|-------------|------------|--------------|------------------|-------------|------------|
| 26   | milligr.,09 | de glucose | fournissent  | 51               | milligr.,67 | Cu         |
| 26   | —           | 09         | de galactose | —                | 49          | — 06 »     |
| donc | 52          | —          | 18           | de lact. hydrol. | —           | 100 — 73 » |

Maintenant, si on calcule le volume de liqueur titrée de permanganate qui doit correspondre à 100 milligr.,73 de Cu, on trouve :

$$\frac{100,73}{0,009846} = 10 \text{ cm}^3,23$$

En résumé, si, dans le dosage du lactose dans la solution témoin, on emploie 6 cm<sup>3</sup> 9 d'une liqueur titrée de permanganate dont 1 cm<sup>3</sup> = 0,009846 de Cu, après hydrolyse complète, il faudra employer 10 cm<sup>3</sup>,2 de cette même solution de permanganate.

La différence est très nette : 3 cm<sup>3</sup>,3 et l'on peut suivre

facilement l'hydrolyse du lactose, déterminer sûrement s'il y a eu ou non dédoublement du sucre et même donner la valeur de cette hydrolyse.

*Action de l'alcool méthylique sur les ferments de l'émulsine.*

On a mis en contact 2 gr. d'émulsine avec 100 cm<sup>3</sup> d'alcool méthylique à 90 p. 100. L'alcool à ce titre ne dissout pas traces d'émulsine. On a abandonné le mélange à la température du laboratoire (16 à 18°) pendant un mois.

Au bout de ce temps, on a recueilli le ferment et on l'a séché dans le vide sulfurique.

Dans 5 solutions aqueuses toluénées renfermant chacune, pour 25 cm<sup>3</sup>, la 1<sup>re</sup>, 0,25 de lactose, la 2<sup>e</sup>, 0,25 de méthylgalactoside  $\beta$ , la 3<sup>e</sup>, 0,25 de méthylglucoside  $\beta$ , la 4<sup>e</sup>, 0,25 de salicine et la 5<sup>e</sup>, 0,25 d'amygdaline, on a ajouté 0 gr.,05 de cette émulsine. Dans une seconde série de flacons, on a ajouté 0 gr.,05 d'émulsine n'ayant pas séjourné dans l'alcool méthylique.

Avec l'émulsine ayant séjourné pendant un mois dans l'alcool méthylique, on a constaté l'hydrolyse du méthylglucoside  $\beta$ , de la salicine et de l'amygdaline.

Mais tandis qu'en 2 ou 3 jours, la rotation de la solution de salicine a passé de  $-1^{\circ}12'$  à  $+38'$  et celle de la solution d'amygdaline de  $-42'$  à  $+40'$ , ce qui correspond à des hydrolyses à peu près complètes, l'action sur le méthylglucoside  $\beta$  a été bien plus lente : en 26 jours, la rotation a passé de  $-36'$  à  $+8'$ , alors qu'une hydrolyse totale du méthylglucoside  $\beta$  aboutit à une rotation de  $+58'$ .

Rappelons à ce sujet que VERDON (1) a remarqué qu'après un séjour de cinq mois dans une solution de glucose dans l'alcool méthylique à 95 p. 100, l'émulsine peut en-

(1) Contribution à l'étude de l'action synthétisante de l'émulsine. Action de l'émulsine sur le glucose en solution dans l'alcool méthylique. — *Thèse doct. Univ. (Pharm.)*, p. 24, Paris, 1913.

core hydrolyser la salicine, alors qu'elle a perdu toute action sur le méthylglucoside  $\beta$ .

Dans les solutions de lactose et de méthylgalactoside  $\beta$ , il n'y a pas eu hydrolyse, même en 42 jours, tandis que l'émulsine neuve, à la température ordinaire, hydrolysait, dans le même temps, 44,55 p. 100 de lactose, et faisait passer la rotation de la solution de méthylgalactoside  $\beta$  de  $\pm 0$  à  $+ 44'$ .

Là encore, lactase et galactosidase  $\beta$  ont la même propriété : destruction facile par l'alcool méthylique.

### *Essai dans l'alcool éthylique.*

On a répété avec l'alcool éthylique à 90 p. 100, la même expérience qu'on a prolongée 3 mois. L'émulsine est également insoluble dans l'alcool à ce titre. Au bout de ce temps, on n'a pu constater aucune différence entre l'activité de cette émulsine et celle de l'émulsine neuve, tant sur le lactose et le méthylgalactoside  $\beta$  que sur le méthylglucoside  $\beta$ , la salicine et l'amygdaline.

L'alcool éthylique, à la température ordinaire, n'a pas d'action nocive sur les ferments qui hydrolysent ces principes.

Il n'en est plus de même si on opère avec l'alcool éthylique à 80 p. 100, à  $+ 38^{\circ}$ - $40^{\circ}$ . Après un contact de 16 jours avec cet alcool et à cette température, l'émulsine n'agit plus sur le lactose, ni sur l'éthylgalactoside  $\beta$  ; elle agit encore sur la salicine : en 2 jours, la rotation de la solution de salicine a passé de  $- 1^{\circ}12'$  à  $+ 30'$ .

Comme on l'a vu plus haut (page 11), l'hydrolyse du lactose et des alcoolgalactosides  $\beta$  est bien plus rapide à  $+ 38^{\circ}$ - $40^{\circ}$  qu'à la température ordinaire.

On a donc essayé, à cette température, l'hydrolyse du lactose et de l'éthylgalactoside  $\beta$  par l'émulsine ayant séjourné dans l'alcool à 80 p. 100.

L'émulsine neuve a hydrolysé, en 9 jours, 88,23 p. 100 du lactose, tandis que l'émulsine ayant séjourné 16 jours dans l'alcool éthylique à  $+38^{\circ}$ - $40^{\circ}$  n'a pas agi sur le lactose. Il en est de même pour l'éthylgalactoside  $\beta$  dont l'hydrolyse a été nulle avec cette dernière émulsine, tandis que l'émulsine neuve faisait passer, en 6 jours, la rotation de la solution de  $-12'$  à  $+10'$ .

### *Essai dans l'alcool amylique.*

On a effectué cet essai dans l'alcool amylique saturé d'eau, c'est-à-dire dans un mélange formé sensiblement de 91 parties d'alcool amylique et de 9 parties d'eau, et à différentes températures : 18 à  $19^{\circ}$  ;  $30^{\circ}$  ; 38 à  $40^{\circ}$ . L'émulsine est insoluble dans cet alcool.

L'alcool amylique saturé d'eau, tant à la température du laboratoire (18 à  $19^{\circ}$ ) qu'à  $+30^{\circ}$  et à  $+38^{\circ}$ - $40^{\circ}$ , n'a pas affaibli l'activité fermentaire de l'émulsine : l'hydrolyse du lactose, de l'éthylgalactoside  $\beta$  et de la salicine a été identique avec l'émulsine neuve et l'émulsine traitée.

### *Essai dans l'acétone.*

On a effectué dans l'acétone renfermant, pour 100 gr., 20 gr. d'eau et 80 gr. d'acétone du bisulfite, l'essai à diverses températures. L'acétone à ce titre ne dissout pas l'émulsine.

a.— *Température ordinaire.*— Au bout de 7 jours de contact, à la température ordinaire, on a recueilli le ferment et on l'a séché dans le vide sulfurique. Ensuite, on l'a fait agir sur des solutions aqueuses toluénées de lactose, d'éthylgalactoside  $\beta$  et de salicine préparées comme il est dit précédemment. On a obtenu les résultats rassemblés dans le tableau suivant :

TABLEAU I.

| SOLUTIONS DE :             | ROTATION<br>initiale<br>(1=2) | ROTATION<br>observée au bout de :<br>(1=2) |       |             | LACTOSE<br>hydrolysé p. 100<br>en 9 jours |             |
|----------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------|-------|-------------|-------------------------------------------|-------------|
|                            |                               |                                            |       | TÉMOIN<br>— |                                           | TÉMOIN<br>— |
| Lactose.....               |                               |                                            |       |             | 78,43                                     | 88,23       |
| Ethylgalactoside $\beta$ . | — 8'                          | 9 jours                                    | + 20' | + 20'       |                                           |             |
| Salicine.....              | — 1°12'                       | 1 jour                                     | + 34' | + 34'       |                                           |             |

A la température ordinaire, en 7 jours, l'acétone aqueux à 80 p. 100 n'a pas d'action nocive sur l'émulsine; il en est de même, à la température de  $+ 30^{\circ}$ , pendant le même temps.

b. — *Température + 38°-40°.* — On a répété l'expérience précédente à  $+ 38^{\circ}$ - $40^{\circ}$ . Au bout de 7 jours de contact, le ferment a été recueilli et séché, puis on l'a fait agir, comme ci-dessus, sur des solutions aqueuses de lactose, d'éthylgalactoside  $\beta$  et de salicine. On a observé les résultats suivants :

TABLEAU II.

| SOLUTIONS DE :             | ROTATION<br>initiale<br>(1=2) | ROTATION<br>observée au bout de :<br>(1=2) |         |             | LACTOSE<br>hydrolysé p 100<br>en 2 jours |             |
|----------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------|---------|-------------|------------------------------------------|-------------|
|                            |                               |                                            |         | TÉMOIN<br>— |                                          | TÉMOIN<br>— |
| Lactose.....               |                               |                                            |         |             | 62,09                                    | 88,23       |
| Ethylgalactoside $\beta$ . | — 8'                          | 9 jours                                    | $\pm$ 0 | + 20'       |                                          |             |
| Salicine.....              | — 1°12'                       | 1 jour                                     | + 34'   | + 34'       |                                          |             |

En examinant ce tableau, on remarque que l'hydrolyse du lactose est ralentie, puisqu'en 9 jours, à  $+ 38^{\circ}\text{--}40^{\circ}$ , elle n'atteint que 62,09 p. 100, alors que l'émulsine neuve hydrolyse, pendant le même temps et à la même température, 88,23 p. 100 de lactose.

L'hydrolyse de l'éthylgalactoside  $\beta$  est encore plus faible; la rotation a passé, en 9 jours, à  $+ 38^{\circ}\text{--}40^{\circ}$ , de  $- 8'$  à  $\pm 0$ , ce qui fait un changement de  $8'$ , tandis qu'avec l'émulsine neuve, on obtient une différence de  $28'$  (de  $- 8'$  à  $+ 20'$ ).

Comme on le voit, l'émulsine ayant séjourné 7 jours, à  $+ 38^{\circ}\text{--}40^{\circ}$ , dans l'acétone à 80 p. 100, a perdu une partie de son activité sur le lactose et la diminution de cette activité est encore plus grande sur l'éthylgalactoside  $\beta$ .

Si on prolonge le contact, à  $+ 38^{\circ}\text{--}40^{\circ}$ , dans l'acétone, on obtient, en 16 jours, un produit fermentaire qui agit encore parfaitement sur le lactose, mais qui n'a plus aucune action sur l'éthylgalactoside  $\beta$ , comme le prouvent les résultats contenus dans le tableau suivant :

TABLEAU III.

| SOLUTIONS DE :             | ROTATION<br>initiale<br>(l=2) | ROTATION<br>observée au bout de :<br>(l=2) |        | LACTOSE<br>hydrolysé p. 100<br>en 17 jours |
|----------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------|--------|--------------------------------------------|
| Lactose.....               |                               |                                            |        | 68.62                                      |
| Ethylgalactoside $\beta$ . | $- 8'$                        | 17 jours                                   | $- 8'$ |                                            |

Au cours de cette expérience, on a fait, en même temps que les examens polarimétriques de la solution d'éthylgalactoside  $\beta$ , des essais à la liqueur de Fehling; mais, à

aucun moment, on n'a pu déceler la présence de sucre réducteur ; la galactosidase  $\beta$  était donc détruite.

Ce fait semble bien montrer que les ferments, qui hydrolysent le lactose et l'éthylgalactoside  $\beta$ , ne sont pas identiques ; aussi, nous laisserons le terme de « *lactase* » pour le ferment qui hydrolyse le lactose, et nous appellerons le ferment qui hydrolyse les alcoolgalactosides  $\beta$  « *galactosidase  $\beta$*  ».

---



## DEUXIÈME PARTIE.

---

### Expériences effectuées avec l'alcool éthylique.

---

#### CHAPITRE PREMIER.

---

##### *Acti n synthétisante de la galactosidase $\beta$ dans des alcools éthyliques de différents titres.*

On a préparé une série de liquides hydroalcooliques renfermant, pour 100 gr., 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 et 80 grammes d'alcool éthylique pur.

Dans 100 cm<sup>3</sup> de chacun de ces liquides, on a dissous environ 1 gr. de galactose (la proportion exacte a été déterminée par dosage); pour l'alcool à 80 p. 100, seul, qui ne dissout pas 1 p. 100 de galactose, on a fait de la même manière une solution à 0 gr., 50 p. 100.

Tous ces liquides ont été abandonnés à la température du laboratoire.

Dans l'étude de la glucosidification des alcools par l'émulsine, il avait suffi, pour suivre la marche de la réaction, d'examiner les liquides au polarimètre, à des intervalles réguliers, la réaction étant considérée comme arrêtée, et par conséquent l'équilibre atteint, lorsqu'on avait constaté la même déviation dans trois examens consécutifs.

Ici le procédé est difficilement applicable pour deux raisons :

1° L'action synthétisante se poursuit très lentement, surtout dans les alcools faibles, de sorte que les changements optiques ne sont appréciables que si on attend un long temps ;

2° Le pouvoir rotatoire du galactose dans l'alcool éthylique varie fortement, suivant le titre alcoolique de la solution, suivant la température à laquelle se fait l'observation et aussi suivant la dilution, comme l'a démontré M. C. TANRET (1).

Voici d'ailleurs quelques données sur ces variations pour des alcools éthyliques à 30, 60 et 80 gr. p. 100 (2).

On a opéré sur le galactose que l'on a préparé et qui présentait, en solution aqueuse à  $+20^{\circ}$ , un pouvoir rotatoire de  $\alpha_D = +79^{\circ},75$  (Voir Chapitre I, page 10).

*Pouvoir rotatoire à la température du laboratoire :*

1° Dans l'alcool éthylique à 30 gr. p. 100 ;  $\alpha_D = +71^{\circ},2$ .

( $p = 0,4795$  ;  $v = 50$  ;  $l = 2$  ;  $\alpha = +1^{\circ}22'$  ;  $t = +20^{\circ}$ )

2° Dans l'alcool éthylique à 60 gr. p. 100 ;  $\alpha_D = +63^{\circ},3$  (3)

( $p = 0,4865$  ;  $v = 50$  ;  $l = 2$  ;  $\alpha = +1^{\circ}14'$  ;  $t = +20^{\circ}$ )

3° Dans l'alcool éthylique à 80 gr. p. 100 ;  $\alpha_D = +57^{\circ}$

( $p = 0,2480$  ;  $v = 50$  ;  $l = 2$  ;  $\alpha = +34'$  ;  $t = +20^{\circ}$ )

Les solutions, qui avaient servi pour ces déterminations, ont été mises dans des flacons hermétiquement bouchés et portées à l'étuve à  $+30^{\circ}$  et à  $+38^{\circ}$ .

L'examen au polarimètre de ces solutions a été fait dans un tube préalablement maintenu aux mêmes températures.

(1) C. TANRET. — Sur les modifications moléculaires et la multirotation des sucres. *Bull. Soc. Chim.* 3<sup>e</sup> série, XV, p. 195, 1896.

(2) Em. BOURQUELOT et G. MOUGNE. — Etude des meilleures conditions de préparation biochimique de l'éthylgalactoside  $\beta$ . *Journ. Pharm. et Chim.* (7), X, p. 157, 1914.

(3) On avait mis par erreur  $\alpha_D = +61^{\circ},3$ .

Les pouvoirs rotatoires, sans tenir compte de la dilatation des liquides, sont devenus :

|    |                                              |  |  | à 30°   | à 38°   |
|----|----------------------------------------------|--|--|---------|---------|
| 1° | Pour l'alcool éthylique à 30 gr. p. 100..... |  |  | + 66°   | + 62°,5 |
| 2° | — — — 60 — .....                             |  |  | + 59°,9 | + 56°,5 |
| 3° | — — — 80 — .....                             |  |  | + 50°,4 | + 43°,6 |

Les chiffres obtenus dans cette expérience ne représentent pas les pouvoirs rotatoires vrais du galactose, parce qu'à + 30° et à + 38°, le volume des solutions alcooliques subit une augmentation sensible.

Par suite, pour avoir les pouvoirs rotatoires exacts, à ces températures, il était indispensable de déterminer l'augmentation de volume de chaque solution.

Pour cela, on a opéré de la façon suivante :

On s'est servi d'un tube en verre divisé en 1/10 de cm<sup>3</sup> et d'une contenance de 25 cm<sup>3</sup>, dans lequel on a ajouté 20 cm<sup>3</sup> de solution alcoolique ; ce tube a été bouché et mis, avec un thermomètre, dans une éprouvette remplie d'eau jusqu'au niveau de la solution contenue dans le tube. On a placé le tout dans un bain-marie qui a été chauffé graduellement jusqu'à + 20°, + 30°, + 38°.

On a obtenu les volumes suivants :

|    |                                                            | à + 20°                | à + 30°                | à + 38°                |
|----|------------------------------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 1° | 20 cm <sup>3</sup> d'alc. éthyl. à 30 gr. p. 100 ont donné | 20 cm <sup>3</sup> ,05 | 20 cm <sup>3</sup> ,2  | 20 cm <sup>3</sup> ,3  |
| 2° | »            »            60    »            »             | 20 cm <sup>3</sup> ,15 | 20 cm <sup>3</sup> ,35 | 20 cm <sup>3</sup> ,5  |
| 3° | »            »            80    »            »             | 20 cm <sup>3</sup> ,2  | 20 cm <sup>3</sup> ,45 | 20 cm <sup>3</sup> ,65 |

Avec ces données, les pouvoirs rotatoires sont :

A. — A la température de + 30° :

1° Dans l'alcool éthylique à 30 gr. p. 100 ;  $\alpha_D = + 66°,4$

( $p = 0,4795$  ;  $v = 50 \text{ cm}^3,37$  ;  $l = 2$  ;  $\alpha = + 1°16'$ )

2° Dans l'alcool éthylique à 60 gr. p. 100 ;  $\alpha_D = + 60°,5$

( $p = 0,4865$  ;  $v = 50 \text{ cm}^3,49$  ;  $l = 2$  ;  $\alpha = + 1°10'$ )

3° Dans l'alcool éthylique à 80 gr. p. 100 ;  $\alpha_D = + 51^\circ$

( $p = 0,2480$  ;  $v = 50 \text{ cm}^3 61$  ;  $l = 2$  ;  $\alpha = + 6^\circ 30'$ )

B. — A la température de  $+ 38^\circ$  :

1° Dans l'alcool éthylique à 30 gr. p. 100 ;  $\alpha_D = + 63^\circ,3$

( $p = 0,4795$  ;  $v = 50 \text{ cm}^3 62$  ;  $l = 2$  ;  $\alpha = + 1^\circ 12'$ )

2° Dans l'alcool éthylique à 60 gr. p. 100 ;  $\alpha_D = + 57^\circ,4$

( $p = 0,4865$  ;  $v = 50 \text{ cm}^3 86$  ;  $l = 2$  ;  $\alpha = + 1^\circ 6'$ )

3° Dans l'alcool éthylique à 80 gr. p. 100 ;  $\alpha_D = + 44^\circ,6$

( $p = 0,2480$  ;  $v = 51 \text{ cm}^3 11$  ;  $l = 2$  ;  $\alpha = + 0^\circ 26'$ )

On a donc renoncé à suivre l'expérience au polarimètre ; on l'a suivie en effectuant, à des intervalles assez longs, des dosages du galactose restant.

Le tableau suivant donne les résultats obtenus :

| QUANTITÉ<br>d'alcool p. 100 | GALACTOSE combiné p. 100 au bout de : |        |        |        |        |            |
|-----------------------------|---------------------------------------|--------|--------|--------|--------|------------|
|                             | 1 mois                                | 4 mois | 6 mois | 7 mois | 8 mois | 9 mois 1/2 |
| 20 grs.....                 | 75,92                                 | 19,70  | 23,03  | 27,28  | 27,77  | 29,47      |
| 30.....                     | 22,16                                 | 29,92  | 32,01  | 34,98  | 37,31  | 38,52      |
| 40.....                     | 23,32                                 | 33,40  | 36,3   | 38,10  | 39,06  | 39,64      |
| 50.....                     | 28,57                                 | 38,10  | 41,4   | 46,    | 45,84  | 45,36      |
| 60.....                     | 36,29                                 | 47,32  | 48,1   | 50,46  | 49,24  | 49,90      |
| 70.....                     | 56,75                                 | 57,28  | 58,1   | 60,62  | 59,41  | 59,06      |
| 80.....                     | 59,66                                 | 67,55  | 69,2   | 69,2   | 69,2   | 69,2       |

Comme on le voit, au début, la réaction est assez rapide dans les alcools les plus concentrés (70 et 80 p. 100); puis elle se ralentit sensiblement pour s'arrêter au bout de 5 mois environ pour l'alcool à 80 p. 100 ; au bout de 6 mois 1/2 environ dans les alcools à 70, 60 et 50 p. 100 ; au bout de 7 mois 1/2 environ dans l'alcool à 40 p. 100.

Pour les alcools à 30 et à 20 p. 100, elle se poursuit encore, mais avec une lenteur extrême, même après le huitième mois.

Si on compare la marche de la galactosidification par l'émulsine avec celle de la glucosidification par le même produit fermentaire, dans le même alcool et à la même température, on trouve des différences profondes.

La première réaction est bien plus lente que la seconde, puisqu'elle se poursuit encore, au bout de 8 mois, dans les alcools à 20 et à 30 p. 100, tandis que, dans les mêmes alcools, la glucosidification est terminée en 8 jours.

Cette lenteur extrême de la réaction tient vraisemblablement à deux causes : l'émulsine des amandes ne renferme qu'une faible proportion de galactosidase  $\beta$ , et ce ferment agit lentement à la température ordinaire, sa température optimale d'action étant à  $+38^{\circ}$ - $40^{\circ}$ , comme je l'ai montré précédemment (page 11).

On n'a pu atteindre, par cela même, la fin de la réaction, mais il ne ressort pas moins, de l'examen du tableau, qu'ici, comme dans la glucosidification, la réaction va d'autant plus loin que l'alcool est plus concentré et qu'elle est plus rapide au début dans les alcools forts que dans les alcools faibles.

Comme on n'a pu atteindre l'état d'équilibre, dans les alcools faibles, entre galactose et galactoside, on a essayé si une élévation de température ne permettrait pas d'arriver à cet équilibre.

---

## CHAPITRE II.

---

### *Influence de la température sur la marche de la réaction.*

On a vu précédemment que c'est vers la température de  $+ 38^{\circ}$ - $40^{\circ}$  que la galactosidase  $\beta$  agit le mieux, en tant qu'agent hydrolysant ; mais, en s'appuyant sur la réversibilité des actions fermentaires (1), on peut dire qu'à cette température la rapidité de la réaction synthétisante sera également augmentée.

Les expériences qu'on a effectuées, à  $+ 30^{\circ}$  et à  $+ 38^{\circ}$ - $40^{\circ}$ , confirment pleinement cette manière de voir.

On a donc préparé deux nouvelles séries de liquides hydroalcooliques semblables aux précédents ; une série a été maintenue à  $+ 30^{\circ}$ , l'autre à  $+ 38^{\circ}$ - $40^{\circ}$ .

La marche de la synthèse n'ayant pu être suivie au polarimètre pour les raisons déjà indiquées, seul, le dosage du galactose restant m'a permis de déterminer, d'une façon précise, la limite de la réaction.

A. — *Température de  $+ 30^{\circ}$ .* — Dans le tableau suivant sont rassemblés les résultats obtenus à  $+ 30^{\circ}$  :

(1) Em. BOURQUELOT et M. BRIDEL. — Synthèse de glucosides d'alcools à l'aide de l'émulsine. La réversibilité des actions fermentaires. — *Journ. Pharm. et Chim.* (7), VI, p. 164, 1912.

| QUANTITÉ<br>d'alcool p. 100 | GALACTOSE combiné p. 100 au bout de : |        |        | ROTATION<br>observée au bout<br>de 4 mois<br>(1 = 2) |
|-----------------------------|---------------------------------------|--------|--------|------------------------------------------------------|
|                             | 3 mois                                | 4 mois | 5 mois |                                                      |
| 10 grs.....                 | 14,74                                 | 21,94  | 20,66  | + 1°2'                                               |
| 20.....                     | 24,88                                 | 27,28  | 27,77  | + 1°8'                                               |
| 30.....                     | 34,98                                 | 40 31  | 40,14  | + 1°6'                                               |
| 40.....                     | 39,14                                 | 44,88  | 45,84  | + 52'                                                |
| 50.....                     | 39,14                                 | 44,88  | 45,84  | + 44'                                                |
| 60.....                     | 46,                                   | 46,    | 46,93  | + 24'                                                |
| 70.....                     | 53,38                                 | 53,38  | 54,92  | + 6'                                                 |
| 80.....                     | 67,24                                 | 67,24  | 67,77  | + 0                                                  |

Si l'on compare les chiffres de ce tableau avec ceux du tableau précédent représentant les résultats obtenus à la température ordinaire, on voit que la température de + 30° favorise nettement la synthèse dans les alcools faibles. En effet, à la température ordinaire, la synthèse a porté, dans l'alcool à 20, sur 19,70 p. 100 du galactose, en 4 mois, et, à + 30°, en 3 mois, sur 24,88 p. 100, et, en 4 mois, sur 27,28 p. 100. Il en est de même dans les alcools à 30, à 40, à 50, l'augmentation de la proportion de galactose combiné étant respectivement de 10,39, de 11,48 et de 6,78 p. 100.

Un fait qui frappe encore, c'est que les résultats sont les mêmes dans l'alcool à 40 et dans l'alcool à 50. Cela tient à ce que la galactosidase  $\beta$  est plus facilement détruite dans ce dernier alcool.

Dans les alcools forts, l'action synthétisante est plus forte, à la température ordinaire, qu'à  $+ 30^{\circ}$  : en 4 mois, 47,32 p. 100 de galactose combiné dans l'alcool à 60, 57,28 dans l'alcool à 70, 67,55 dans l'alcool à 80, et, à  $+ 30^{\circ}$ , respectivement 46, 53,38, 67,24. Cela est dû à ce que la température de  $+ 30^{\circ}$  exerce une action destructrice sur la galactosidase  $\beta$  et la synthèse se trouve arrêtée. En effet, les chiffres, indiquant la proportion de galactose combiné, sont les mêmes après 4 mois qu'après 3 mois : le ferment est donc détruit, dans les alcools forts à  $+ 30^{\circ}$ , en moins de 3 mois.

B. — *Température de  $+ 38^{\circ}$ - $40^{\circ}$ .* — On vient de voir que la galactosidase  $\beta$  est détruite lentement à  $+ 30^{\circ}$ , dans les alcools forts, et l'on savait déjà que sa destruction est réalisée, en 16 jours, dans l'alcool à 80 gr. p. 100, à  $+ 38^{\circ}$ - $40^{\circ}$ . On a fait cette expérience, cependant, dans le but de savoir s'il y aurait une synthèse appréciable avant la destruction du ferment.

En conséquence, après 4 jours, on a dosé le sucre restant dans les liquides. On a trouvé les résultats suivants :

| Alcool à | 10 gr. p. 100, | 9,29 | p. 100 de galactose combiné. |
|----------|----------------|------|------------------------------|
| — 20 —   | 10,37          | —    | —                            |
| — 30 —   | 9,19           | —    | —                            |
| — 40 —   | 9,19           | —    | —                            |
| — 50 —   | 9,19           | —    | —                            |
| — 60 —   | 11,74          | —    | —                            |
| — 70 —   | 13,63          | —    | —                            |
| — 80 —   | 24,55          | —    | —                            |

Ainsi, la galactosidification de l'alcool éthylique, qui se fait très lentement à la température ordinaire, a lieu rapidement à  $+ 38^{\circ}$ - $40^{\circ}$ , surtout dans les alcools forts, puisqu'en 4 jours seulement, la synthèse a porté sur 11,74 pour 100 du galactose dans l'alcool à 60, 13,63 dans l'alcool à 70, 24,55 dans l'alcool à 80.

Etant donnés ces résultats, on a continué l'expérience,

mais comme la synthèse devait s'arrêter rapidement par suite de la destruction de la galactosidase  $\beta$ , on a pris soin d'ajouter, tous les 5 ou 6 jours, une nouvelle quantité de ferment (0 gr. 80 d'émulsine).

Les résultats, fournis par les dosages du galactose effectués avant chaque nouvelle addition de ferment, ont été réunis dans le tableau de la page suivante.

L'équilibre a été atteint, dans l'alcool à 10 et à 20, entre le 20<sup>e</sup> et le 25<sup>e</sup> jour, puisqu'une nouvelle addition de ferment n'a pas fait repartir la réaction.

Dans l'alcool à 30, l'équilibre a été atteint entre le 25<sup>e</sup> et le 31<sup>e</sup> jour. Il est intéressant de remarquer la vitesse relativement grande de la réaction en comparant les résultats obtenus à la température ordinaire. Dans l'alcool à 20, il y a eu, en 25 jours, 35,37 p. 100 de galactose combiné, tandis qu'à la température ordinaire, en 9 mois et demi, on n'était arrivé qu'à 29,47 p. 100. Dans l'alcool à 30, la proportion de galactose combiné s'élève à 43,61 pour 100 en 31 jours, au lieu de 38,52 p. 100, en 9 mois et demi, à la température ordinaire.

Le rapprochement de ces deux résultats montre très nettement l'influence considérable qu'exerce la température sur l'activité de la galactosidase  $\beta$ .

Dans tous les autres alcools, l'équilibre n'était pas atteint le 46<sup>e</sup> jour, mais il nous a été impossible de continuer l'expérience à cette température. Ces essais ont été faits dans le courant du mois de juillet 1914 et la mobilisation générale du 2 août a amené la fermeture des laboratoires de l'Ecole de Pharmacie. Il a donc fallu laisser tous ces liquides à la température ordinaire.

On peut néanmoins examiner les résultats obtenus avec les alcools à 40 et à 50. A chaque dosage, la proportion de galactose combiné était plus forte dans l'alcool à 40 que dans l'alcool à 50; de 3 à 4 p. 100 environ; au dosage effectué le 46<sup>e</sup> jour, les proportions étaient égales, 49,27 p. 100.

| QUANTITÉ<br>d'alcool p. 100 | GALACTOSE<br>pour 100 cm <sup>3</sup> | GALACTOSE combiné p. 100 au bout de : |          |          |          |          |          |          |
|-----------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|                             |                                       | 8 jours                               | 14 jours | 20 jours | 25 jours | 31 jours | 41 jours | 46 jours |
| 10 grs.....                 | 0,9832                                | 12,79                                 | 14,36    | 17,92    | 24,46    | 24,46    | 24,46    | 24,46    |
| 20.....                     | 0,9832                                | 16,80                                 | 24,28    | 30,65    | 35,37    | 35,37    | 35,37    | 35,37    |
| 30.....                     | 0,9704                                | 20,42                                 | 28,62    | 37,44    | 42,49    | 43,61    | 43,61    | 43,61    |
| 40.....                     | 0,9704                                | 19,12                                 | 27,32    | 32,11    | 39,12    | 42,49    | 45,98    | 49,27    |
| 50.....                     | 0,9704                                | 16,83                                 | 23,90    | 27,32    | 34,52    | 39,67    | 43,61    | 49,27    |
| 60.....                     | 0,9704                                | 19,12                                 | 28,62    | 33,22    | 40,23    | 45,98    | 48,08    | 50,39    |
| 70.....                     | 0,9854                                | 26,16                                 | 38,86    | 45,64    | 48,87    | 51,14    | 54,57    | 57,92    |
| 80.....                     | 0,9854                                | 45,64                                 | 57,92    | 59,62    | 61,15    | 62,33    | 63,40    | 64,44    |

On retrouve là le même fait que j'ai déjà observé dans l'expérience effectuée à la température de  $+ 30^{\circ}$ . Comme on le voit, c'est donc bien dans l'alcool à 50 que la galactosidase  $\beta$  est le plus rapidement détruite.

Dans l'alcool à 60, la synthèse est rapide au début : en 25 jours, elle s'élève à 40,23 p. 100 ; elle se ralentit ensuite et n'augmente plus que de 10 p. 100 dans les 16 derniers jours.

Il en est de même pour les alcools à 70 et à 80, le ralentissement étant encore plus marqué.

Dans l'alcool à 80, par exemple, la proportion de galactose combiné est de 59,62 p. 100, en 20 jours, et, dans les 26 jours suivants, elle ne s'élève plus que de 4,82 p. 100.

Ce ralentissement de la synthèse, vers la fin de la réaction, a toujours été remarqué dans tous les essais de glucosidification.

Il est, ici, encore plus net qu'ailleurs, par suite de la destruction rapide du ferment sous l'action de la chaleur.

Si on compare ces résultats avec ceux qui ont été obtenus à la température ordinaire, on voit qu'en 1 mois, dans l'alcool à 60, il y a eu, à  $+ 38^{\circ}$ - $40^{\circ}$ , 45,98 p. 100 de galactose combiné et 36,29 à la température ordinaire ; dans l'alcool à 70, les proportions sont de 51,14 et 56,75 et, dans l'alcool à 80, de 62,33 et 59,66.

Ces derniers chiffres sont assez près l'un de l'autre, et, il semblerait que l'influence de la température sur la vitesse de la réaction, dans l'alcool à 60, est plutôt faible. Il n'en est rien : pour s'en convaincre, il suffit d'examiner ces chiffres du tableau, et l'on verra que la réaction est déjà fortement ralentie, au bout d'un mois, comme on l'a signalé tout à l'heure.

Les différents essais, ayant été abandonnés à la température ordinaire, pour les raisons données plus haut, ont été examinés de nouveau trois mois après. On a obtenu les résultats suivants :

|                        |                                   |
|------------------------|-----------------------------------|
| Alcool à 40 gr. p. 100 | 52,78 de galactose combiné p. 100 |
| — 50 —                 | 54,96 —                           |
| — 60 —                 | 57,27 —                           |
| — 70 —                 | 59,97 —                           |
| — 80 —                 | 67,83 —                           |

La réaction s'est donc continuée, dans tous les alcools, et l'on peut considérer que les chiffres obtenus correspondent sensiblement à l'état d'équilibre.

L'expérience suivante appuie cette manière de voir. Elle est calquée sur celle de MM. BOURQUELOT et BRIDEL qui leur a permis de démontrer la réversibilité de l'action de l'émulsine, en milieu alcoolique, sur le glucose et le glucoside  $\beta$  de l'alcool (*loco citato*) :

A<sub>1</sub>. — HYDROLYSE.

Ethylgalactoside  $\beta$ ... 0,5680  
Alcool éthylique à 20 gr. p. 100 q. s. p<sup>r</sup> 50 cm<sup>3</sup>

B<sub>1</sub>. — HYDROLYSE.

Ethylgalactoside  $\beta$ ... 0,5693  
Alcool éthylique à 70 gr. p. 100 q. s. p<sup>r</sup> 50 cm<sup>3</sup>

A<sub>2</sub>. — SYNTHÈSE.

Galactose pur.... 0,4916  
Alcool éthylique à 20 gr. p. 100 q. s. p<sup>r</sup> 50 cm<sup>3</sup>

B<sub>2</sub>. — SYNTHÈSE.

Galactose pur.... 0,4927  
Alcool éthylique à 70 gr. p. 100 q. s. p<sup>r</sup> 50 cm<sup>3</sup>

Les proportions de galactose dans A<sub>2</sub> et B<sub>2</sub> sont, comme on le voit, respectivement égales à celles qui entrent dans la composition de l'éthylgalactoside de A<sub>1</sub> et de B<sub>1</sub>.

On a ajouté à chacune de ces solutions 0,40 d'émulsine, puis on les a placées à l'étuve à la température de + 38°-40°.

Comme on sait que la galactosidase  $\beta$  est détruite assez rapidement à + 38°-40°, on a ajouté, une nouvelle dose de ferment, tous les 5 jours environ.

On a suivi la marche de la réaction en effectuant, de temps en temps, des dosages de sucre réducteur.

L'équilibre est atteint, lorsqu'après une nouvelle addition de ferment, la réaction ne repart plus.

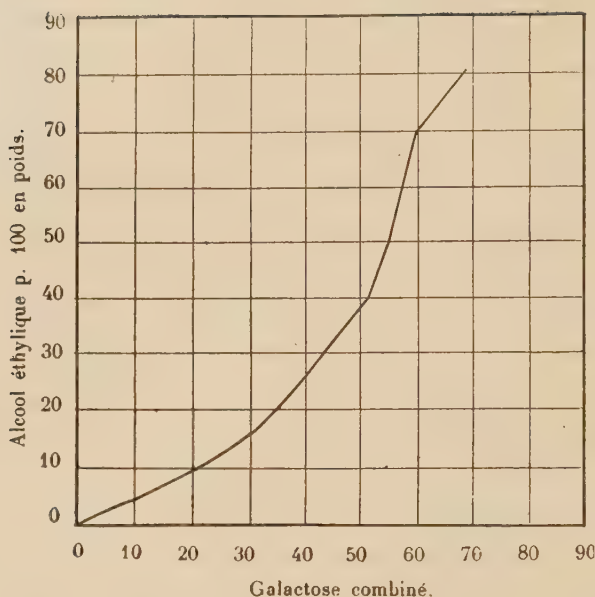
Dans le tableau ci-dessous sont rassemblés les résultats de ces essais :

|                | GALACTOSE<br>à l'arrêt | DURÉE<br>de la réaction |
|----------------|------------------------|-------------------------|
| A <sub>1</sub> | 0,6370                 | 25 jours environ        |
| A <sub>2</sub> | 0,6354                 | » »                     |
| B <sub>1</sub> | 0,3934                 | » »                     |
| B <sub>2</sub> | 0,3944                 | 4 mois 1/2              |

On arrive donc sensiblement à des chiffres égaux que l'on parte du galactose ou de la quantité correspondante d'éthylgalactoside  $\beta$ .

Dans cette expérience, le galactose libéré s'élève à 64,78 p. 100, dans l'alcool à 20, et à 39.92 p. 100, dans l'alcool à 70, l'équilibre serait donc à 35,22 et à 60.08 p. 100 de galactose combiné. Or, dans les essais relatés plus haut, on arrive, comme synthèse, à 35,37 et à 59,97 p. 100.

C'est en se basant sur cette expérience que j'ai pu dire que l'on pouvait considérer les chiffres, obtenus précédemment, comme représentant sensiblement l'état d'équilibre des réactions. Si l'on représente les résultats graphiquement, on obtient la courbe ci-dessous :



J'ai établi cette courbe en prenant comme abscisses les quantités de galactose combiné, et comme ordonnées les titres en centième des alcools éthyliques, dans lesquels a eu lieu la combinaison.

Cette courbe est la courbe des synthèses ; elle est également celle des hydrolyses, d'après ce qui a été dit plus haut.

Elle part du point zéro représentatif de l'eau pure tenant en solution 1 gr. de galactose p. 100 ; elle s'élève d'abord lentement, puis rapidement jusqu'à l'alcool à 70 p. 100, à partir duquel elle s'incline légèrement.

En résumé, à la température de  $+38^{\circ}$ - $40^{\circ}$ , la vitesse de la réaction étant considérablement augmentée, on a pu arriver, après addition, tous les 5 ou 6 jours, d'une nouvelle dose de ferment, à l'état d'équilibre dans tous les alcools considérés.

---

### CHAPITRE III.

---

#### *Etude des conditions expérimentales les mieux appropriées à la préparation de l'éthylgalactoside $\beta$ .*

Comme on vient de le voir dans le chapitre précédent, c'est à la température de  $+ 38^{\circ}$ - $40^{\circ}$ , que la galactosidase  $\beta$  agit le plus rapidement. On a vu également que c'est dans l'alcool à 80 p. 100, que l'on obtient la synthèse la plus forte. On doit donc, pour obtenir une quantité appréciable d'éthylgalactoside  $\beta$ , opérer à  $+ 38^{\circ}$ - $40^{\circ}$  et dans l'alcool à 80 p. 100. Mais cet alcool n'ayant qu'un faible pouvoir dissolvant vis-à-vis du galactose, on a dû faire les essais sur des liquides renfermant, pour 100 cm<sup>3</sup>, 0 gr., 50 de galactose seulement. Sion avait dû recourir à des solutions aussi diluées, il aurait fallu employer un volume trop considérable de liquide.

MM. BOURQUELOT et BRIDEL ont reconnu que, pour divers alcools ne dissolvant que fort peu de glucose, on avait intérêt à opérer la glucosidification en présence d'un excès de ce sucre, excès qui se dissout peu à peu, au fur et à mesure de la combinaison du glucose en solution. Ces auteurs ont opéré de la sorte pour les glucosides des alcools butylique, isobutylique, isoamylique, benzylique, cinnamylque, etc...

J'ai essayé d'appliquer ce procédé pour l'éthylgalactoside  $\beta$

J'ai fait 2 essais, l'un avec l'alcool à 70 p. 100, à  $+ 30^{\circ}$ , l'autre avec l'alcool à 80 p. 100, à  $+ 38^{\circ}$ - $40^{\circ}$ .

*Essai dans l'alcool à 70 p. 100 à + 30°.* — On a préparé le mélange fermentaire suivant :

|                                         |                      |
|-----------------------------------------|----------------------|
| Galactose .....                         | 50 gr.               |
| Alcool à 70, q. s. p <sup>r</sup> ..... | 1000 cm <sup>3</sup> |
| Emulsine .....                          | 8 gr.                |

On a laissé le flacon à l'étuve, à + 30°, pendant 3 mois, en agitant de temps en temps. Comme on n'a pas ajouté de nouvelles quantités d'émulsine, il était inutile de prolonger l'expérience, puisqu'on a vu précédemment que la galactosidase  $\beta$  est tuée, par un séjour de 3 mois à + 30°, dans les alcools forts.

Au bout de ce temps, on a filtré pour séparer l'émulsine et l'excès de galactose. Le liquide filtré renfermait, pour 100 cm<sup>3</sup>, 4 gr., 50 de résidu sec dont 2 gr., 054 de galactose libre.

Le reste, formé d'éthylgalactoside  $\beta$ , pesait donc 2 gr., 44, soit 2 gr., 11 de galactose.

Autrement dit, la proportion de galactose combiné s'élève par rapport au galactose mis en œuvre à 42,34 pour 100, et par rapport au galactose dissous à 50,75 p. 100.

Remarquons qu'avec une solution à 1 p. 100 de galactose, on était arrivé, dans le même temps, à une synthèse de 53,38 p. 100.

Le liquide filtré a été évaporé à sec et le résidu dissous dans 700 cm<sup>3</sup> d'eau distillée. On a ajouté à la solution 10 grammes de glucose, et on a fait fermenter, par la levure de bière basse, 15 gr.

La rotation de la solution a passé de + 6°18' à — 16', en 10 jours, à la fin de la fermentation.

On a filtré, on a fait bouillir en présence de carbonate de chaux ; on a filtré de nouveau et on a évaporé à sec. L'extrait pesant 26 gr. a été épuisé, d'abord par 200 cm<sup>3</sup> d'alcool absolu bouillant, puis par 100 cm<sup>3</sup>. Les solutions alcooliques réunies ont été évaporées à sec, et l'on a obtenu ainsi 19 gr., 50 d'éthylgalactoside  $\beta$  qu'on a purifié par re-

cristallisation dans l'alcool absolu. Finalement, on a eu 16 gr. d'éthylgalactoside  $\beta$  pur.

*Essai dans l'alcool à 80 p. 100 à  $+38^{\circ}$ - $40^{\circ}$ .* — On a préparé le mélange suivant :

|                         |                      |
|-------------------------|----------------------|
| Galactose.....          | 100 gr.              |
| Alcool à 80 p. 100..... | 2000 cm <sup>3</sup> |
| Emulsine.....           | 16 gr.               |

Comme on sait que la galactosidase  $\beta$  est rapidement détruite dans ces conditions, on a eu soin d'ajouter, tous les 5 ou 6 jours, une nouvelle dose d'émulsine.

On a laissé le mélange à l'étuve, à  $+38^{\circ}$ - $40^{\circ}$ , pendant 1 mois. La rotation de la solution filtrée, qui était au début de  $+1^{\circ}16'$ , avait baissé jusqu'à  $+48'$ . Au bout d'un mois, on a filtré et on a procédé au dosage du galactose non dissous et du galactose dissous.

On a trouvé 26 gr., 70 de galactose non dissous et 27 gr., 50 de galactose libre, en solution : il s'était donc combiné 45 gr., 80 de galactose.

En d'autres termes, la proportion de galactose combiné s'élève, par rapport au galactose total, à 45,80 p. 100, et, par rapport au galactose entré en solution, à 62,48 p. 100.

Dans l'essai fait avec une solution à 0 gr., 50 de galactose p. 100, on est arrivé à combiner, en 31 jours, 62,33 pour 100 de sucre : les deux résultats sont donc identiques.

Si on compare ces chiffres avec ceux de la première expérience, on voit qu'on a obtenu, ici, près de 12 p. 100 de galactoside de plus et en 3 fois moins de temps.

On a extrait le galactoside de ce liquide en suivant exactement la marche indiquée dans l'expérience précédente : fermentation du galactose libre par la levure de bière basse, après addition de glucose, et cristallisation de l'éthylgalactoside  $\beta$  dans l'alcool absolu.

On a obtenu ainsi 34 gr. d'éthylgalactoside  $\beta$ .

On a profité de ce que l'on avait une forte quantité de

ce galactoside pour le purifier complètement et vérifier quelques-unes de ses constantes.

Pour cela, l'éthylgalactoside  $\beta$  a été recristallisé, à plusieurs reprises, dans l'alcool absolu et enfin séché dans le vide sulfurique. Il est alors parfaitement incolore ; il cristallise en aiguilles dures groupées en rosettes ; il n'est pas hygroscopique.

Il fond nettement au tube capillaire à  $+ 161^{\circ}$  (corr.) et au bloc Maquenne à  $+ 161^{\circ}$ - $162^{\circ}$ . Son pouvoir rotatoire, en solution aqueuse, est égal à :  $\alpha_D = - 7^{\circ},21$ .

$$(p = 1,4905 ; v = 15 ; l = 2 ; \alpha_D = - 1^{\circ}26' ; t = + 20^{\circ})$$

Il ne réduit pas la liqueur de Fehling. L'émulsine des amandes l'hydrolyse assez rapidement à  $+ 38^{\circ}$ - $40^{\circ}$  (voir page 11).

Remarquons qu'E. FISCHER et ARMSTRONG ont indiqué comme pouvoir rotatoire  $\alpha_D = - 4^{\circ},01$ , et comme point de fusion  $+ 153^{\circ}$ - $155^{\circ}$ . Il est vraisemblable que ces auteurs n'avaient à leur disposition qu'un produit insuffisamment purifié.

En résumé, il ressort de ce que l'on vient de voir que, pour obtenir une notable quantité d'éthylgalactoside  $\beta$ , on devra opérer à la température de  $+ 38^{\circ}$ - $40^{\circ}$ , dans l'alcool à 80 p. 100, en présence d'un excès de galactose, en ayant soin d'ajouter, tous les 5 ou 6 jours, une nouvelle dose de ferment.

---

## TROISIÈME PARTIE.

---

### Expériences effectuées avec l'alcool méthylique.

---

#### CHAPITRE I.

---

#### *Action synthétisante de la galactosidase $\beta$ dans des alcools méthyliques de différents titres.*

On a préparé, comme précédemment, une série de liquides hydroalcooliques renfermant pour 100 gr., 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 et 90 gr. d'alcool méthylique. Dans 100 cm<sup>3</sup> de chacun de ces liquides on a ajouté environ 1 gr. de galactose (dont la proportion exacte a été déterminée par dosage) et 0,80 d'émulsine d'amandes.

On a abandonné tous ces liquides à la température du laboratoire.

Nous avons vu, pour l'alcool éthylique, que le pouvoir rotatoire du galactose varie très fortement suivant le degré alcoolique de la solution et aussi suivant la température à laquelle se fait l'observation.

Ici, il en est de même avec l'alcool méthylique. Ainsi, on a déterminé le pouvoir rotatoire du galactose dans des alcools méthyliques à 30, 60 et 90 gr. pour 100.

*Pouvoir rotatoire à la température du laboratoire :*

1° Dans l'alcool méthylique à 30 p. 100 ;  $\alpha_D = +73^{\circ},3$ .

( $p = 0,3725$  ;  $v = 40$  ;  $l = 2$  ,  $\alpha = +1^{\circ}22'$  ;  $t = +16^{\circ}$ .)

2° Dans l'alcool méthylique à 60 p. 100 ;  $\alpha_D = + 65^{\circ},7$ .

$$(p = 0,4940 ; v = 50 ; l = 2 ; \alpha = + 1^{\circ}18' ; t = + 16^{\circ})$$

3° Dans l'alcool méthylique à 90 p. 100 ;  $\alpha_D = + 51^{\circ},6$ .

$$(p = 0,1935 ; v = 40 ; l = 2 ; \alpha = + 30' ; t = + 20^{\circ}).$$

Les solutions, ayant servi à déterminer ces pouvoirs rotatoires, ont été portées à  $+ 30^{\circ}$  et à  $+ 40^{\circ}$ . Les pouvoirs rotatoires, sans tenir compte de la dilatation des liquides, sont devenus :

|    |                                      |    | à $30^{\circ}$   | à $40^{\circ}$   |
|----|--------------------------------------|----|------------------|------------------|
| 1° | Pour l'alcool méthylique à 30 p. 100 |    | $+ 64^{\circ},4$ | $+ 59^{\circ}$   |
| 2° | »                                    | 60 | $+ 59^{\circ}$   | $+ 52^{\circ},2$ |
| 3° | »                                    | 90 | $+ 48^{\circ},1$ | $+ 41^{\circ},3$ |

Pour avoir les pouvoirs rotatoires vrais du galactose à ces températures, on a vu précédemment (page 23) qu'il était nécessaire de déterminer l'augmentation de volume des solutions alcooliques.

En opérant d'une façon identique, on a obtenu les volumes suivants :

|    |                                                                                 |                        |  | à $+ 30^{\circ}$       | à $+ 40^{\circ}$      |
|----|---------------------------------------------------------------------------------|------------------------|--|------------------------|-----------------------|
| 1° | 20 cm <sup>3</sup> d'alcool méthylique à 30 p. 100 ont donné à $+ 16^{\circ}$ ; | 20 cm <sup>3</sup> ,05 |  | 20 cm <sup>3</sup> ,20 | 20 cm <sup>3</sup> ,3 |
| 2° | » » 60 » ;                                                                      | 20 cm <sup>3</sup> ,1  |  | 20 cm <sup>3</sup> ,3  | 20 cm <sup>3</sup> ,5 |
| 3° | » » 90 à $+ 20^{\circ}$ ;                                                       | 20 cm <sup>3</sup> ,15 |  | 20 cm <sup>3</sup> ,4  | 20 cm <sup>3</sup> ,6 |

Avec ces données les pouvoirs rotatoires sont devenus :

A. — A la température de  $+ 30^{\circ}$  :

1° Dans l'alcool méthylique à 30 p. 100 ;  $\alpha_D = + 64^{\circ},8$ .

$$(p = 0,3725 ; v = 40,29 ; l = 2 ; \alpha = + 1^{\circ}12').$$

2° Dans l'alcool méthylique à 60 p. 100 ;  $\alpha_D = + 59^{\circ},5$ .

$$(p = 0,4940 ; v = 50,49 ; l = 2 ; \alpha = + 1^{\circ}10').$$

3° Dans l'alcool méthylique à 90 p. 100 ;  $\alpha_D = + 48^{\circ},7$ .

$$(p = 0,1935 ; v = 40,49 ; l = 2 ; \alpha = + 0^{\circ}28')$$

B. — A la température de + 40° :

1° Dans l'alcool méthylique à 30 p. 100 ;  $\alpha_D = + 59^{\circ},7$ .

( $p = 0,3725$  ;  $v = 40,29$  ;  $l = 2$  ;  $\alpha = + 1^{\circ},6$ )

2° Dans l'alcool méthylique à 60 p. 100 ;  $\alpha_D = + 53^{\circ},3$ .

( $p = 0,4940$  ;  $v = 50,99$  ;  $l = 2$  ;  $\alpha = + 1^{\circ},2$ )

3° Dans l'alcool méthylique à 90 p. 100 ;  $\alpha_D = + 42^{\circ},2$ .

( $p = 0,1935$  ;  $v = 40,89$  ;  $l = 2$  ;  $\alpha = + 0^{\circ} 24'$ )

Ces variations, d'après la température, sont relativement fortes, et, même dans des solutions renfermant 1 gr. de galactose p. 100 cm<sup>3</sup>, une différence de plusieurs degrés dans la température, au moment de l'observation, amène un écart de plusieurs minutes dans la rotation.

C'est pour cette raison, comme pour l'alcool éthylique, qu'on a renoncé à suivre l'expérience au polarimètre ; on l'a suivie en effectuant, de temps en temps, des dosages de sucre réducteur.

Dans le tableau de la page suivante sont rassemblés les résultats obtenus.

En examinant ce tableau, on voit que la synthèse la plus faible a eu lieu dans l'alcool à 10 p. 100 et que c'est dans l'alcool à 30 que la synthèse est la plus forte, 36,9 p. 100, puis viennent ensuite l'alcool à 40 et l'alcool à 80, 35,08 p. 100. Si on excepte l'alcool à 10 p. 100, les résultats sont assez rapprochés, puisqu'ils ne varient que de 31,46 à 36,9 p. 100.

La réaction n'a pas atteint l'équilibre normal entre le galactoside et ses composants, puisque la proportion de galactose combiné n'augmente pas avec le titre alcoolique. Cette irrégularité apparente que l'on observe ici dans la marche de la synthèse s'explique par ce fait que l'émulsine d'amande ne renferme qu'une faible quantité de galactosidase  $\beta$ , que la galactosidase  $\beta$  agit lentement à la

température ordinaire, et qu'elle est détruite peu à peu dans l'alcool méthylique.

| QUANTITÉ<br>d'alcool p. 100 | GALACTOSE<br>p. 100 cm <sup>3</sup> | GALACTOSE<br>libre<br>à l'arrêt de<br>la réaction | GALACTOSE<br>combiné<br>p. 100 | TEMPS<br>après lequel<br>on a fait<br>le dosage |
|-----------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------------------|
| 10 gr.....                  | 0,971                               | 0,727                                             | 25,08                          | 2 mois                                          |
| 20 .....                    | 0,961                               | 0,633                                             | 34,04                          | »                                               |
| 30 .....                    | 0,971                               | 0,612                                             | 36,95                          | »                                               |
| 40 .....                    | 0,961                               | 0,623                                             | 35,08                          | »                                               |
| 50 .....                    | 0,950                               | 0,644                                             | 32,21                          | »                                               |
| 60 .....                    | 0,984                               | 0,664                                             | 32,48                          | »                                               |
| 70 .....                    | 0,971                               | 0,644                                             | 33,63                          | »                                               |
| 80 .....                    | 0,961                               | 0,623                                             | 35,08                          | »                                               |
| 90 .....                    | 0,984                               | 0,674                                             | 31,46                          | »                                               |

La réaction s'est donc arrêtée par suite de la destruction du ferment avant que l'équilibre ne soit atteint, puisque la réaction repart quand on ajoute de nouveau du ferment.

Ainsi, après avoir ajouté de nouveau 0,40 d'émulsine, dans chacun des liquides hydroalcooliques, on a dosé, au bout d'une action de 8 jours, le galactose non combiné. On a obtenu les résultats consignés dans le tableau suivant :

| QUANTITÉ<br>d'alcool p. 100 | GALACTOSE<br>restant p. 100 cm <sup>3</sup> | GALACTOSE<br>combiné p. 100 |
|-----------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------|
| 20 gr.....                  | 0,567                                       | 40,99                       |
| 30 .....                    | 0,533                                       | 45,02                       |
| 40 .....                    | 0,523                                       | 45,53                       |
| 50 .....                    | 0,553                                       | 41,80                       |
| 60 .....                    | 0,577                                       | 41,35                       |
| 70 .....                    | 0,553                                       | 43,02                       |
| 80 .....                    | 0,513                                       | 46,59                       |

On voit que, dans tous les alcools, l'addition d'une nouvelle quantité de ferment a produit une nouvelle synthèse, l'augmentation étant, dans tous les liquides, de 9 à 10 p. 100.

C'est dans l'alcool à 80 que se trouve être la synthèse la plus forte, 46,59 p. 100, puis viennent ensuite l'alcool à 40 avec 45,53 p. 100 et l'alcool à 30 avec 45,02 p. 100.

L'irrégularité que l'on a constatée au début de l'expérience se maintient encore ici.

On n'a pas renouvelé l'addition de ferment, mais il est permis de penser que la réaction arrêtée serait encore repartie.

En résumé, la marche de la réaction synthétisante de la galactosidase  $\beta$ , dans l'alcool méthylique, à la température ordinaire, est irrégulière par suite de l'action destructrice de l'alcool sur le ferment.

---

## CHAPITRE II.

---

### *Influence de la température sur la marche de la synthèse du méthylgalactoside $\beta$ .*

La galactosidase  $\beta$  étant détruite par l'alcool méthylique, très rapidement, quand on élève la température, (voir page 14), on a fait seulement un essai à  $+ 30^{\circ}$ .

Pour cela, on a préparé, comme précédemment, une nouvelle série de liquides hydroalcooliques.

On a abandonné tous les mélanges fermentaires à l'étuve à  $+ 30^{\circ}$ .

La marche de la réaction a été suivie en effectuant de temps en temps des dosages de galactose non combiné.

Les résultats obtenus sont contenus dans le tableau de la page suivante.

Si on compare ces chiffres avec ceux du 1<sup>er</sup> tableau du chapitre précédent, on constate que, dans les alcools faibles jusqu'à l'alcool à 40 p. 100 compris, la synthèse est plus forte à  $+ 30^{\circ}$ .

Dans l'alcool à 10, il y a 29,30 de galactose combiné au lieu de 25,08 ; dans l'alcool à 20, 41,58 p. 100 au lieu de 34,04 ; dans l'alcool à 30, 49,39 au lieu de 36,95 et dans l'alcool à 40, 38,41 p. 100 au lieu de 35,08.

Mais à partir de l'alcool à 50, la synthèse est moindre, 17,79 p. 100, par exemple, dans l'alcool à 80 au lieu de 35,08 à la température ordinaire.

C'est dans l'alcool à 30 que la synthèse est la plus forte, et, à partir de cet alcool, elle va en diminuant au fur et à mesure que le titre alcoolique s'élève.

| QUANTITÉ<br>d'alcool p. 100 | GALACTOSE<br>p. 100 cm <sup>3</sup> | GALACTOSE<br>non<br>combiné | GALACTOSE<br>combiné<br>p. 100 | TEMPS<br>après<br>lequel on a<br>fait le<br>dosage |
|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|----------------------------------------------------|
| 10 gr.....                  | 0,971                               | 0,686                       | 29,30                          | 2 mois                                             |
| 20 .....                    | 0,961                               | 0,561                       | 41,58                          | »                                                  |
| 30 .....                    | 0,971                               | 0,491                       | 49,39                          | »                                                  |
| 40 .....                    | 0,961                               | 0,591                       | 38,41                          | »                                                  |
| 50 .....                    | 0,950                               | 0,664                       | 30,06                          | »                                                  |
| 60 .....                    | 0,984                               | 0,758                       | 23,01                          | »                                                  |
| 70 .....                    | 0,971                               | 0,779                       | 19,70                          | »                                                  |
| 80 ....                     | 0,961                               | 0,790                       | 17,79                          | »                                                  |
| 90 .....                    | 0,984                               | 0,809                       | 17,78                          | »                                                  |

Cette faible synthèse dans les alcools forts est due à la destruction rapide de la galactosidase  $\beta$  dans les conditions de l'expérience. D'ailleurs, le ferment est détruit dans tous les liquides avant que le terme de la réaction ait été atteint. On a ajouté, dans chaque flacon, 0 gr., 40 d'émulsine, et on a dosé le galactose libre après une action de 8 jours. On a trouvé les chiffres inscrits dans le tableau suivant :

| QUANTITÉ<br>d'alcool p. 100 | GALACTOSE<br>non combiné | GALACTOSE<br>combiné p. 100 |
|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| 20 gr.....                  | 0,502                    | 47,70                       |
| 30 .....                    | 0,437                    | 54,95                       |
| 40 .....                    | 0,502                    | 47,70                       |
| 50 .....                    | 0,598                    | 37,07                       |
| 60 .....                    | 0,732                    | 25,65                       |
| 70 .....                    | 0,775                    | 20,10                       |
| 80 ..                       | 0,743                    | 22,68                       |

La réaction est donc répartie dans tous les liquides, mais toujours faiblement dans les alcools forts. Cette nouvelle synthèse confirme ce que l'on vient de dire, à savoir que la réaction était arrêtée par suite de la destruction du ferment.

C'est dans l'alcool à 30 que la synthèse est la plus forte, c'est le seul milieu dans lequel elle ait dépassé les 50 p. 100.

En résumé, on doit considérer, qu'ici, comme à la température ordinaire, et en dépit de synthèses plus fortes dans les alcools faibles, l'équilibre n'est atteint dans aucun liquide. La destruction rapide du ferment dans l'alcool méthylique ne permettrait pas d'arriver à cet équilibre, même en rajoutant fréquemment de nouvelles quantités de ferment, comme on l'a fait pour l'alcool éthylique.

Les seules indications utiles que l'on peut tirer de cette

étude, c'est que la température de  $+ 30^{\circ}$  favorise la synthèse dans les alcools faibles, et que, c'est l'alcool à 30 p. 100 qui constitue le milieu le plus favorable.

Dans le chapitre suivant on verra qu'on a mis ces indications à profit.

---

### CHAPITRE III.

#### *Etude des conditions expérimentales les mieux appropriées à la préparation du méthylgalactoside $\beta$ .*

On vient de voir que, pour obtenir le méthylgalactoside  $\beta$  avec le meilleur rendement, il fallait opérer dans l'alcool à 30 p. 100 et à la température de  $+ 30^{\circ}$ .

Les expériences qui ont permis de tirer cette conclusion ont été faites dans une solution de galactose à environ 1 p. 100.

Il ressort d'un travail de MM. Em. BOURQUELOT et Em. VERDON que, si on augmente la quantité de glucose dissous dans l'alcool méthylique (1), la quantité de glucoside formé par rapport au glucose est sensiblement la même. On a voulu voir s'il en était de même avec le galactose, dans le but de préparer plus facilement une grande quantité de galactoside.

#### *Essai I.*

|                                  |                                 |
|----------------------------------|---------------------------------|
| Galactose pur.....               | 18 gr., 696                     |
| Alcool méthylique à 30 p. 100 .. | Q. S. pour 2000 cm <sup>3</sup> |
| Emulsine...                      | 16 gr.                          |

Le mélange renfermait 0 gr.,9348 de galactose p. 100 cm<sup>3</sup>. Au bout d'un mois, il n'en renfermait plus que 0 gr.,5878. On a, à nouveau, ajouté 16 gr. d'émulsine: en

(1) Em. BOURQUELOT et Em. VERDON. — De l'emploi des proportions croissantes de glucose dans la synthèse biochimique du méthylglucoside  $\beta$ . Influence des produits de la réaction sur l'arrêt de celle-ci (*Journal de Pharm. et de Chim.*, (7), VII, p. 575, 1913).

15 jours, la proportion de galactose libre a baissé à 0 gr.,480 pour 100 cm<sup>3</sup>.

La synthèse a porté, en un mois et demi, sur 48,65 p. 100 du galactose.

### *Essai II.*

|                                 |                                 |
|---------------------------------|---------------------------------|
| Galactose pur....               | 36 gr.,530                      |
| Alcool méthylique à 30 p. 100.. | Q. S. pour 2000 cm <sup>3</sup> |
| Emulsine ...                    | 16 gr.                          |

Le mélange renfermait, pour 100 cm<sup>3</sup>, 1 gr.,8265 de galactose. Au bout de deux mois, la quantité de galactose libre était de 1 gr.,135 pour 100 cm<sup>3</sup>. On a ajouté de nouvelle émulsine (16 gr.) et, en 15 jours, la proportion de galactose est tombée à 0 gr.,878 pour 100 cm<sup>3</sup>, soit une synthèse de 51,92 p. 100.

### *Essai III.*

|                                 |                              |
|---------------------------------|------------------------------|
| Galactose.....                  | 7 gr.,60                     |
| Alcool méthylique à 30 p. 100.. | Q. S. p. 100 cm <sup>3</sup> |
| Emulsine.....                   | 1 gr.                        |

On a laissé ce mélange, pendant 3 mois, sans ajouter de nouvelle émulsine. La déviation a passé de + 11°40' à + 6°24' et la proportion de galactose a baissé de 7 gr.,60 à 4 gr.,01, soit une synthèse de 47,23 p. 100.

On n'a pas ajouté de nouveau ferment ; mais, d'après ce que l'on a vu précédemment, une addition de ferment aurait encore augmenté la proportion de galactose combiné.

Pour isoler le méthylgalactoside  $\beta$  formé dans ces essais, on a opéré exactement comme pour l'éthylgalactoside  $\beta$ .

Voici, par exemple, le détail de l'opération sur le liquide de l'essai II :

On a filtré le mélange ; on a distillé le filtrat à sec, sous pression réduite. Le résidu obtenu, composé de mé-

thylgalactoside  $\beta$  et de galactose et pesant 46 gr., a été dissous dans 900 cm<sup>3</sup> d'eau distillée. On a ajouté 10 gr. de glucose et 15 gr. de levure basse, lavée et essorée. On a abandonné le mélange fermentaire à la température ordinaire.

La fermentation a duré 10 jours. La rotation de la solution aqueuse, qui était avant la fermentation de  $+6^{\circ}54'$ , avait passé à  $-20'$ . On a filtré, porté à l'ébullition en présence d'une petite quantité de carbonate de chaux ; on a filtré à nouveau et on a évaporé le filtrat à sec, sous pression réduite. Le résidu, qui pesait 20 gr., a été repris par 200 cm<sup>3</sup> d'alcool absolu bouillant en présence de charbon animal. On a filtré le liquide bouillant, puis on a fait 2 autres épuisements avec 100 cm<sup>3</sup> d'alcool absolu chacun. Par refroidissement et repos, le méthylgalactoside  $\beta$  a cristallisé dans les trois liqueurs.

On a obtenu 9 gr.,50 de méthylgalactoside  $\beta$  qu'on a purifié par une nouvelle cristallisation dans 200 cm<sup>3</sup> d'alcool absolu.

Ce procédé permet donc d'obtenir assez facilement du méthylgalactoside  $\beta$  en quantités suffisantes pour pouvoir le purifier complètement.

Le méthylgalactoside  $\beta$  *pur* cristallise en fines aiguilles incolores ; il fond nettement au tube capillaire à  $+178^{\circ}4$  (corr.). Em. FISCHER, qui a décrit le premier ce corps, le donne comme inactif sur la lumière polarisée ; en réalité, le méthylgalactoside  $\beta$  est légèrement lévogyre. Son pouvoir rotatoire est de :

$$\alpha_D = -0^{\circ},419$$

$$(p = 2,9815; v = 15; l = 2; \alpha = -10'; t = +18^{\circ})$$

Pour le méthylgalactoside  $\beta$ , comme pour l'éthylgalactoside  $\beta$ , le procédé de synthèse par le ferment, permet d'obtenir un corps plus pur et en plus grande quantité, que par les procédés chimiques.

En résumé, si on veut obtenir une assez forte proportion de méthylgalactoside  $\beta$ , on devra opérer sur un mélange ainsi formé :

|                                |                                 |
|--------------------------------|---------------------------------|
| Galactose...                   | 150 gr.                         |
| Alcool méthylique à 30 p. 100. | Q. S. pour 2000 cm <sup>3</sup> |
| Emulsine...                    | 20 gr.                          |

On laissera ce mélange, pendant un mois et demi à deux mois, à l'étuve à  $+ 30^{\circ}$ , en ayant soin d'agiter assez souvent, et de remettre tous les 15 jours une nouvelle dose d'émulsine. On obtiendra, en opérant ainsi, une synthèse qui portera sur 50 p. 100 au moins du galactose mis en œuvre.

---



## QUATRIÈME PARTIE.

---

### La galactosidase dans le règne végétal.

---

#### CHAPITRE PREMIER.

---

##### *Recherches de la galactosidase $\beta$ dans le règne végétal (1).*

La galactosidase  $\beta$  est un ferment qui possède à la fois la propriété de combiner le galactose  $\beta$  avec les alcools pour former des alcoolgalactosides  $\beta$  et celle d'hydrolyser ces mêmes alcoolgalactosides  $\beta$ .

Ce ferment existe en faible proportion dans l'émulsine des amandes, et c'est lui qui intervient dans la synthèse des alcoolgalactosides, qui se produit lorsqu'on ajoute de l'émulsine à une solution alcoolique de galactose.

J'ai recherché ce ferment dans divers végétaux avec l'espoir de trouver un produit fermentaire renfermant la galactosidase  $\beta$  en plus grande quantité que l'émulsine des amandes.

Disons tout de suite que, si ces expériences ont démontré que la galactosidase  $\beta$  existe dans tous les végétaux qui, comme l'a établi BRACHIN, hydrolysent le lactose et renferment par conséquent de la lactase, elles ne m'ont pas permis de trouver une meilleure source de ferment que les amandes douces.

(1) G. MOUGNE.— *Journal Pharm. et Chim.*, (7), XV, p. 339, 1917.

On a utilisé, pour ces essais, les amandes de prunes, de pêches, d'abricots et de cerises, les semences de pommier, les feuilles fraîches de laurier cerise, d'aucuba, de raifort et les graines de moutarde.

Les essais de synthèse n'ont pu être effectués avec les macérations aqueuses de ces différents produits à cause des matières sucrées qu'ils renferment.

On a traité les amandes des Rosacées, les semences de pommier et les graines de moutarde suivant le procédé indiqué par M. HÉRISSEY pour la préparation de l'émulsion.

Pour les feuilles fraîches, dans un premier essai, on les a broyées et mises à macérer, pendant quarante-huit heures, dans deux fois leur volume d'eau distillée toluénée. Au bout de ce temps, on a filtré le macéré et ajouté quatre fois son volume d'alcool à 85°. Le précipité, recueilli sur un filtre sans plis, a été séché dans le vide sulfuriqué. On a obtenu ainsi de faibles quantités de produits qui étaient tous inactifs.

BRACHIN ayant observé que la macération aqueuse de feuilles fraîches de raifort, par exemple, était totalement inactive sur le lactose, tandis que les feuilles elles-mêmes dédoublaient ce sucre, j'ai pensé que la galactosidase  $\beta$  pouvait rester, elle aussi, insoluble, et j'ai préparé autrement mes produits fermentaires de feuilles fraîches.

Les feuilles fraîches broyées, desséchées à l'étuve à  $+ 30^\circ$ , ont été mises à macérer dans cinq fois leur poids d'alcool à 60°. Au bout de dix jours, on les a recueillies et lavées avec l'alcool à 60°, puis desséchées à nouveau à l'étuve à  $+ 30^\circ$ . Enfin, les feuilles ainsi traitées ont été réduites en poudre fine.

On a effectué les expériences en ajoutant dans 100 cm<sup>3</sup> d'une solution à 1 p. 100 de galactose dans l'alcool éthylique à 50 p. 100 (alcool absolu, 50 gr.; eau, 50 gr.), soit

5 gr. de poudre de feuilles, soit 0 gr.,80 du produit fermentaire obtenu avec les semences.

La marche de la synthèse a été suivie en effectuant, de temps en temps, dans la solution, des dosages de galactose.

**Rosacées.** — *Prunes.* — Les amandes de prunes qu'on a employées ont fourni 0 gr.,30 de poudre fermentaire pour 20 gr. de produit traité.

On a fait agir la totalité du ferment obtenu sur 50 cm<sup>3</sup> de la solution de galactose dans l'alcool éthylique à 50 pour 100.

Le mélange fermentaire a été abandonné à la température ordinaire.

La rotation initiale de la solution qui était de  $+1^{\circ}18'$  a passé, en un mois environ, à  $+52'$ . Au bout de ce temps on a dosé le galactose. On a trouvé 33,25 de galactose combiné pour 100.

La réaction est donc sensiblement aussi rapide qu'avec l'émulsine des amandes.

*Pêches.* — 3 kilogr. de noyaux ont fourni 240 gr. d'amandes avec lesquelles on a obtenu 25 gr. de produit fermentaire.

On a préparé une solution renfermant, pour 50 cm<sup>3</sup> d'alcool à 50 p. 100, 0,50 de galactose, 0,40 de ferment.

Le mélange fermentaire a été maintenu à l'étuve à la température de  $+30^{\circ}$ .

La rotation initiale de la solution qui était de  $+1^{\circ}18'$  a passé, en un mois environ, à  $+44'$ .

L'émulsine de pêches renferme donc de la galactosidase  $\beta$ .

*Abricots.* — On a obtenu 38 gr. de ferment en traitant 3 kilogr. d'amandes mondées.

On a préparé, comme précédemment, une solution ren-

fermant, pour 50 cm<sup>3</sup>, 0,50 de galactose et 0,40 de ferment.

On a abandonné le mélange à la température ordinaire. La rotation initiale de la solution qui était de  $+ 1^{\circ}18'$  a passé, en un mois environ, à  $+ 1^{\circ}4'$ .

En effectuant le dosage du galactose restant, on a trouvé 17,12 de galactose combiné p. 100.

Comme on le voit, la synthèse a été beaucoup plus lente avec le produit fermentaire des abricots qu'avec l'émulsine des amandes.

*Cerises.* — 2 kilogr. de noyaux ont donné 480 gr. d'amandes avec lesquelles on a préparé 25 gr. de poudre fermentaire.

On a fait agir, à la température ordinaire, 0 gr., 40 de ce ferment, sur une solution de galactose dans l'alcool éthylique préparé comme ci-dessus.

Au bout d'un mois environ, la rotation de la solution a passé de  $+ 1^{\circ}18'$  à  $+ 54'$  : donc, présence de galactosidase  $\beta$  et synthèse plus rapide qu'avec le produit des abricots,

*Semences de pommier.* — 800 gr. de semences ont fourni 15 gr. de ferment. On l'a fait agir sur une solution identique aux précédentes.

On a opéré la réaction à l'étuve à  $+ 30^{\circ}$ .

La rotation de la solution a passé, en un mois environ, de  $+ 1^{\circ}18'$  à  $+ 1^{\circ}6'$ .

Ici la synthèse est très faible.

*Laurier cerise.* — On a traité 70 gr. de feuilles fraîches de laurier cerise, récoltées en avril, suivant le procédé précédemment indiqué. Après traitement, cette quantité a fourni 18 gr. de poudre.

On a préparé un mélange renfermant, pour 100 cm<sup>3</sup> d'alcool à 50 p. 100, 5 gr. de poudre de feuilles préparée comme il vient d'être dit et environ 1 gr. de galactose (la

proportion exacte de ce sucre a été déterminée par dosage).

On a conservé, comme témoin, une solution identique ne contenant pas de galactose.

Ces mélanges fermentaires ont été abandonnés à la température ordinaire.

La rotation initiale de la solution qui était de  $+1^{\circ}16'$  a passé, en deux mois environ, à  $+54'$ . Au bout de ce temps on a dosé le galactose. On a trouvé 30,67 de galactose combiné p. 100.

Ensuite, le mélange, dans lequel on avait fait le dosage, a été placé à l'étuve à  $+30^{\circ}$ . Au bout d'une action d'un mois, à cette température, on a dosé à nouveau le galactose non combiné. La quantité de galactose combiné a passé de 30,67 à 52,67 p. 100.

Ici encore, la température augmente la vitesse de la réaction. BRACHIN n'ayant pas recherché la lactase dans les feuilles de laurier cerise, j'ai essayé l'action hydrolysante de ces feuilles sur le lactose.

Pour cela, on a préparé un mélange renfermant, pour  $25\text{ cm}^3$ , 0,25 de lactose pur, 1 gr.,25 de poudre de feuilles préparée comme ci-dessus et 5 gouttes de toluène pour assurer la conservation du mélange fermentaire.

On a réservé, comme témoin, une solution lactosée ne contenant pas de poudre.

Ces mélanges ont été abandonnés à la température ordinaire. Au bout de dix-sept jours, on a dosé le sucre réducteur. Le dosage effectué a donné 12,82 de lactose hydrolysé.

Donc, la lactase et la galactosidase  $\beta$  existent simultanément dans les feuilles de laurier cerise.

**Crucifères.** — *Cochlearia Armoracia* L. — Le traitement de 440 gr. de feuilles fraîches de raifort, récoltées en avril, a fourni 70 gr. de poudre.

L'expérience a été effectuée d'une façon identique à la précédente.

La rotation de la solution a passé, en quinze jours, de  $+ 1^{\circ}16'$  à  $+ 1^{\circ}6'$ . Au bout de ce temps, on a dosé le galactose non combiné. On a trouvé 10,02 de galactose combiné p. 100.

Cette rotation n'a pas changé même au bout de deux mois. A  $+ 30^{\circ}$ , on n'a pas obtenu une synthèse plus forte.

*Sinapis alba* L. — L'opération a porté sur 250 gr. de semences qui ont donné 8 gr.,10 de produit fermentaire.

On a préparé un mélange fermentaire semblable aux précédents qu'on a abandonné à la température ordinaire.

Au bout d'un mois, on a dosé le galactose non combiné. On a trouvé 6,86 de galactose combiné p. 100.

*Sinapis nigra* L. — Le rendement a été de 12 gr.,20 de poudre fermentaire pour 250 gr. de semences traitées.

L'essai a donné des résultats exactement identiques aux précédents.

**Cornées.** — *Aucuba japonica* L. — On a suivi la technique déjà employée pour les feuilles de laurier cerise et de raifort. On a traité 130 gr. de feuilles fraîches d'*aucuba*, récoltées en avril, qui ont fourni 28 gr. de poudre.

La réaction a été opérée à la température ordinaire. La rotation de la solution a passé, en un mois environ, de  $+ 1^{\circ}16'$  à  $+ 1^{\circ}$ . On a dosé le galactose. On a trouvé 15,80 de galactose combiné p. 100.

Au bout de ce temps, on a placé le mélange à l'étuve à  $+ 30^{\circ}$ , mais la réaction n'a pas continué, puisqu'au bout d'un mois, à cette température, la rotation de la solution était toujours de  $+ 1^{\circ}$ .

A côté de tous ces résultats qui laissent prévoir que, par une étude plus étendue, la galactosidase  $\beta$ , comme la

lactase, pourra être décelée dans un grand nombre de végétaux, je vais décrire brièvement quelques expériences négatives.

*Képhyr frais.* — Le produit, prélevé le jour même sur le lait, a été lavé et essoré, puis divisé en deux parts :

Une part a été mise à macérer, pendant 36 heures, dans deux fois son volume d'alcool à 95°. Au bout de ce temps le produit a été desséché à l'étuve à + 30°, puis pulvérisé.

La poudre ainsi obtenue s'est montrée inactive sur le galactose en solution dans l'alcool éthylique, ainsi que sur le lactose et le méthylgalactoside  $\beta$ .

L'autre partie a été ajoutée à une solution aqueuse renfermant 5 gr. de lactose pur dans 100 cm<sup>3</sup>. La rotation de cette solution a passé, en trois jours, de + 5°2' à + 4°48'.

Le dosage du sucre réducteur effectué dans cette solution a montré également qu'une certaine quantité de lactose a été consommée.

Mais on sait, cependant, que MM. BOURQUELOT et HÉRISSEY ont réussi à préparer l'éthylgalactoside  $\beta$  en traitant une solution de galactose dans l'alcool éthylique par une macération aqueuse de grains de képhyr.

*Aspergillus niger* V. Th. — Dans plusieurs mémoires, MM. BOURQUELOT et HÉRISSEY (1) ont montré que l'émulsine des champignons, très active sur l'amygdaline, est cependant sans action sur le lactose.

D'après ce fait, j'ai cherché à savoir si cette émulsine serait capable d'hydrolyser les alcoolgalactosides  $\beta$ .

(1) a.) Sur les propriétés de l'émulsine des champignons (*Journ. de Pharm. et de Chim.*, (6), II, p. 345, 1895).

b.) Les ferments solubles du *Polyporus sulfureus* (*Bull. Soc. Myc. de France*, IX, p. 235, 1895).

c.) Sur la présence de l'émulsine dans les lichens et dans plusieurs champignons non encore examinés à ce point de vue (*Bull. Soc. Myc. de France*, XV, p. 44, 1899).

Pour cela, on a fait une culture d'*Aspergillus niger* sur liquide de RAULIN. Au bout de trois jours, cette culture a été retirée de l'étuve, lavée à l'eau et mise en contact, pendant deux jours, avec une certaine quantité d'eau distillée,

Le liquide fermentaire, filtré, a été essayé sur l'amygdaline et l'éthylgalactoside  $\beta$ .

Tandis que la solution d'amygdaline a passé de  $-44'$  à  $-14'$ , la rotation de la solution d'éthylgalactoside  $\beta$  n'a pas changé, même au bout de quinze jours.

---

## CHAPITRE II.

---

### *Obtention de l'éthylgalactoside $\beta$ à l'aide des amandes d'abricots, de pêches et de cerises, des semences de pommier et du tourteau d'amande amère.*

La présence de la galactosidase  $\beta$  ayant été constatée dans un grand nombre de végétaux, on comprend l'intérêt qu'il y avait à rechercher si l'on pourrait préparer le galactoside au moins avec ceux qui renferment le ferment en proportion suffisante.

C'est ce qu'on a fait avec les amandes d'abricots, de pêches et de cerises, les semences de pommier et le tourteau d'amande amère.

De même que pour l'émulsine des amandes, les essais ont été effectués dans l'alcool à 80 p. 100 en présence d'un excès de galactose, à la température de  $+ 38^{\circ}$ - $40^{\circ}$ , en renouvelant l'addition de ferment tous les 5 ou 6 jours environ, puisqu'on sait que ces conditions sont les plus favorables à la réaction.

Voici les résultats qu'on a obtenus avec le produit fermentaire des amandes d'abricots.

On a préparé un mélange renfermant : 25 gr. de galactose, 4 gr. de poudre fermentaire, 500 cm<sup>3</sup> d'alcool éthylique à 80 p. 100.

On a continué l'expérience comme il est dit ci-dessus. Au bout de 14 jours, on a filtré le liquide et distillé le filtrat à sec, sous pression réduite.

On a dissous le résidu qui pesait 10 gr. dans 150 cm<sup>3</sup>

d'eau distillée ; on a ajouté 2 gr. de glucose et 3 gr. de levure basse, lavée et essorée.

Le mélange a été abandonné à la température ordinaire. La fermentation a duré 2 jours. Pendant ce temps, la rotation de la solution aqueuse a passé de  $+ 6^{\circ}18'$  à  $- 16'$ . On a filtré, porté le liquide à l'ébullition en présence d'une petite quantité de carbonate de chaux, filtré à nouveau et évaporé le filtrat à sec, sous pression réduite. Enfin, le résidu, qui pesait 4 gr., a été repris par 30 cm<sup>3</sup> d'alcool absolu bouillant en présence de noir animal.

On a obtenu ainsi 1 gr.,30 d'éthylgalactoside  $\beta$  qu'on a purifié par une nouvelle cristallisation dans l'alcool absolu.

On a répété, avec les semences de cerises et celles de pommier, la même expérience que ci-dessus ; on a obtenu 2 gr.,10 d'éthylgalactoside  $\beta$  avec les premières et seulement 0 gr.,50 du même galactoside avec les secondes.

Le tourteau d'amande amère a été utilisé, comme source de galactosidase  $\beta$ , après lui avoir fait subir le traitement suivant :

On a humecté préalablement 400 gr. de tourteau avec 200 gr. d'alcool à 70°. La poudre a été malaxée avec le liquide et l'on a fait passer le mélange à travers un tamis à larges mailles de façon à l'obtenir sans grumeaux et bien homogène.

On a laissé en repos, pendant 4 heures, en vases clos. La poudre humectée, introduite dans un percolateur, a été mise en contact, pendant 4 jours, avec de l'alcool à 70° en quantité suffisante pour recouvrir la surface de la poudre d'une couche de 2 à 3 centimètres.

Au bout de ce temps, on a laissé écouler le liquide goutte à goutte, après avoir eu soin d'ajouter fréquemment du dissolvant de façon à maintenir son niveau constamment au-dessus de la poudre.

On a continué la lixiviation jusqu'à épuisement complet du tourteau. Au bout de huit jours, la poudre lixiviée a

été desséchée à l'étuve à  $+ 30^{\circ}$ . Après dessiccation, on a obtenu 235 gr. de poudre débarrassée de ses matières sucrées.

Ensuite, on a préparé un mélange fermentaire contenant : 25 gr. de galactose, 25 gr. de tourteau lixivié, 500 cm<sup>3</sup> d'alcool éthylique à 80 p. 100.

La réaction a été effectuée comme ci-dessus, à  $+ 38^{\circ}$ -40. On a ajouté, tous les 5 jours, une nouvelle dose de tourteau. Au bout de 14 jours, on a arrêté l'expérience.

En suivant la technique décrite plus haut, on a obtenu 2 gr.,30 d'éthylgalactoside  $\beta$ .

Ainsi, on voit que, dans l'essai effectué avec le tourteau, le rendement en galactoside est bien inférieur à celui qu'on obtient en employant l'émulsine des amandes.

Il n'y aurait donc pas avantage, dans une préparation industrielle, à remplacer l'émulsine par le tourteau d'amande.

L'expérience qu'on a effectuée avec les amandes de pêches n'a pas été conduite de la même façon que précédemment. Ici, on a opéré la réaction à la température ordinaire. — Au bout de 3 mois, on a procédé à l'extraction du galactoside formé. — On a obtenu 1 gr.,20 d'éthylgalactoside  $\beta$ .

Le point de fusion de l'éthylgalactoside  $\beta$ , obtenu dans ces différentes expériences, a été trouvé, au bloc de MAQUENNE, égal à  $+ 161^{\circ}$ -162°.

On voit qu'il correspond exactement au point de fusion de l'éthylgalactoside  $\beta$  obtenu à l'aide de l'émulsine des amandes.

En résumé, on a obtenu avec tous ces produits fermentaires, dans lesquels on avait décelé auparavant la galactosidase  $\beta$ , de l'éthylgalactoside  $\beta$  à l'état pur et cristallisé.

---



## CONCLUSIONS.

---

On peut résumer de la façon suivante les principales conclusions des recherches qui viennent d'être exposées :

1° Le galactose s'obtient plus rapidement et avec un meilleur rendement en employant le procédé qui consiste à se débarrasser du glucose par fermentation au moyen de la levure haute.

2° Dans l'alcool méthylique à 90 p. 100, l'émulsine perd, au bout d'un mois, à la température ordinaire, la propriété d'hydrolyser le lactose et le méthylgalactoside  $\beta$ , tandis que d'autres propriétés fermentaires ne sont pas altérées.

Dans l'alcool éthylique à 90 p. 100, placé dans les mêmes conditions, on ne constate aucune différence entre l'activité de cette émulsine et celle de l'émulsine neuve.

A la température de  $+ 38^{\circ}$ - $40^{\circ}$ , après un contact de 16 jours dans l'alcool éthylique à 80 p. 100, l'émulsine n'agit plus sur le lactose, ni sur l'éthylgalactoside  $\beta$ .

Dans l'alcool amylique saturé d'eau, maintenu à différentes températures ( $18^{\circ}$ - $19^{\circ}$ ,  $30^{\circ}$ ,  $38^{\circ}$ - $40^{\circ}$ ), on ne constate pas le moindre affaiblissement de l'activité fermentaire de cette émulsine.

Ces expériences montrent que la lactase et la galactosidase  $\beta$  possèdent de nombreuses propriétés communes.

L'émulsine, mise en contact avec l'acétone aqueux à 80 p. 100, à la température de  $+ 38^{\circ}$ - $40^{\circ}$ , pendant 16 jours, perd toute activité hydrolysante sur l'éthylgalactoside  $\beta$ , tandis qu'elle continue à hydrolyser le lactose.

Cette expérience nous permet de conclure que la lactase et la galactosidase  $\beta$  sont deux ferments différents.

3° Dans des alcools éthyliques de différents titres, contenant en solution environ 1 gr. de galactose pour 100 cm<sup>3</sup>, la galactosidase  $\beta$  détermine une synthèse d'autant plus forte que le titre alcoolique est plus élevé.

4° La température de + 38°-40° est la plus favorable à la synthèse, mais comme la galactosidase  $\beta$  est détruite assez rapidement à cette température, il faut avoir soin d'ajouter à nouveau de l'émulsine, tous les 5 ou six jours environ.

5° Pour obtenir une grande quantité d'éthylgalactoside  $\beta$ , on préparera un mélange correspondant aux proportions suivantes :

Galactose, 5 gr. ; émulsine, 0,80 ; alcool à 80 p. 100, 100 cm<sup>3</sup>.

On effectuera la réaction à la température de 38°-40°, et on ajoutera, tous les 5 ou 6 jours environ, une nouvelle dose d'émulsine.

La réaction, qui se fera très vite au début, se ralentira au bout d'un mois, et à partir de ce moment la quantité de galactoside formé sera très faible ; on n'aura donc pas d'intérêt à attendre la fin de la réaction pour retirer le produit.

6° Dans des alcools méthyliques de différents titres, contenant en solution environ 1 gr. de galactose pour 100 cm<sup>3</sup>, la réaction est très lente à la température ordinaire, à cause de la faible quantité de ferment contenue dans l'émulsine et de la destruction progressive de la galactosidase  $\beta$  : c'est pour ces deux causes que l'on n'a pas pu atteindre l'état d'équilibre dans ces alcools.

7° A la température de + 30°, la proportion de galactoside formé augmente régulièrement avec le titre alcoolique du mélange fermentaire, jusqu'à ce que la concentra-

tion du liquide en alcool devienne nocive pour le ferment ; la proportion de galactose combiné devient alors de plus en plus faible à mesure que le titre alcoolique s'élève.

8° Pour obtenir le méthylgalactoside  $\beta$  en quantité importante, on emploiera l'alcool à 30 p. 100, contenant en solution 7 gr., 50 de galactose pour 100 cm<sup>3</sup> et 1 gr. d'émulsine. On maintiendra le mélange fermentaire à la température de + 30°. On ajoutera tous les 15 jours une nouvelle dose d'émulsine. La réaction sera considérée comme terminée, lorsque la proportion de galactose passé à l'état de galactoside  $\beta$  aura atteint environ 50 p. 100, ce qui demandera de un mois et demi à deux mois.

9° La présence de la galactosidase  $\beta$  a été constatée dans un grand nombre de Rosacées, quelques Crucifères et chez l'Aucuba ; ces essais prouvent que ce ferment, comme la lactase, est très répandu dans le règne végétal.

10° L'obtention de l'éthylgalactoside  $\beta$ , à l'aide de ces différents végétaux, vient appuyer les recherches précédentes.

11° Enfin, on a pu corriger quelques constantes physiques de l'éthylgalactoside  $\beta$  et du méthylgalactoside  $\beta$ , notamment le point de fusion et le pouvoir rotatoire.

C'est ainsi que le pouvoir rotatoire de l'éthylgalactoside  $\beta$  est réellement  $-7^{\circ}.21$ , alors qu'on l'avait trouvé égal à  $-4^{\circ}$ , et que le méthylgalactoside  $\beta$ , que l'on regardait comme inactif, est très légèrement lévogyre : son pouvoir rotatoire étant de  $-0^{\circ}.419$ .

Vu, bon à imprimer :

*Le Président de la Thèse,*  
E. BOURQUELOT.

Vu :

*Le Directeur de l'Ecole,*  
H. GAUTIER.

Vu et permis d'imprimer :

*Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris,*  
L. POINCARÉ.



# TABLE DES MATIÈRES.

---

|                                          | Pages |
|------------------------------------------|-------|
| Introduction.....                        | 1     |
| Méthode de préparation du galactose..... | 7     |

## PREMIÈRE PARTIE.

|                                               |    |
|-----------------------------------------------|----|
| Spécificité de la galactosidase $\beta$ ..... | 11 |
|-----------------------------------------------|----|

## DEUXIÈME PARTIE.

|                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Expériences effectuées avec l'alcool éthylique....                                                                           | 21 |
| CHAPITRE I.— Action synthétisante de la galactosidase $\beta$ dans des alcools éthyliques de différents titres.....          | 21 |
| CHAPITRE II.— Influence de la température sur la marche de la réaction.....                                                  | 26 |
| CHAPITRE III.— Etude des conditions expérimentales les mieux appropriées à la préparation del'éthylgalactoside $\beta$ ..... | 35 |

## TROISIÈME PARTIE.

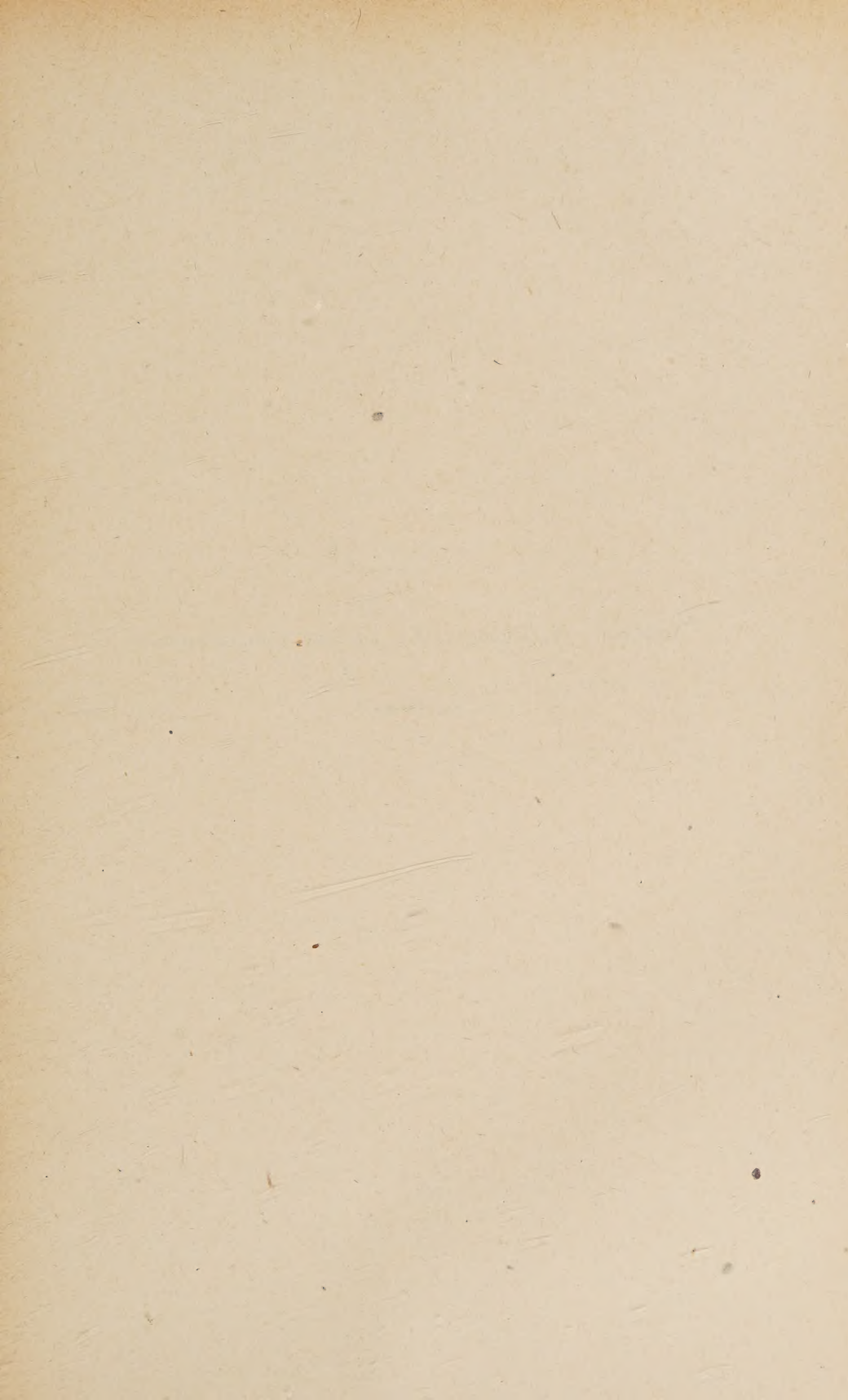
|                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Expériences effectuées avec l'alcool méthylique...                                                                   | 39 |
| CHAPITRE I.— Action synthétisante de la galactosidase $\beta$ dans des alcools méthyliques de différents titres..... | 39 |

|                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| CHAPITRE II. — Influence de la température sur la<br>marche de la synthèse du méthylgalactoside $\beta$                               | 44 |
| CHAPITRE III. — Etude des conditions expérimentales<br>les mieux appropriées à la préparation du mé-<br>thylgalactoside $\beta$ ..... | 48 |

#### QUATRIÈME PARTIE.

|                                                                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| La galactosidase $\beta$ dans le règne végétal.....                                                                                                                                    | 53 |
| CHAPITRE I. — Recherches de la galactosidase $\beta$ dans<br>le règne végétal (Rosacées, Crucifères, Cor-<br>nées).....                                                                | 53 |
| CHAPITRE II. — Obtention de l'éthylgalactoside $\beta$ à<br>l'aide des amandes d'abricots, de pêches et de<br>cerises, des semences de pommier et du tour-<br>teau d'amande amère..... | 61 |
| CONCLUSIONS.....                                                                                                                                                                       | 65 |

---



---

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE L. DECLUME, LONS-LE-SAUNIER.

---



